

Aus der Klinik für Innere Medizin IV
des Universitätsklinikums des Saarlandes, Homburg/Saar

(Direktor: Prof. Dr. H. Köhler)

Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

**Durchflußzytometrische Analyse der T-zellulären Zytokinproduktion zur
Quantifizierung der Wirkstärke von Calcineurin-Inhibitoren und zur
Identifikation präformierter Alloreaktivität**

vorgelegt von

Stephan Thijssen

geboren am 12.07.1973 in Hamm

In Liebe und Dankbarkeit meinen Eltern

Margret und Johannes Thijssen,

die mich bei all meinen Zielen und Vorhaben

in jeder Lebenslage nach Kräften unterstützt haben.

Ergebnisse aus dieser Arbeit wurden in "Transplantation" veröffentlicht:

Sester U, **Thijssen S**, van Bentum K, Neumann F, Kubuschok B, Sester M, Köhler H (2004) Rapid Identification of Preformed Alloreactive T Cells for Use in a Clinical Setting. Transplantation 78:607-614

Darüber hinaus wurden Ergebnisse aus dieser Arbeit auf den folgenden Kongressen vorgestellt (die Vorstellung "T-Cell Crossmatch Assay zur Identifikation von Patienten mit direkter Alloreaktion bei Transplantation" auf dem saarländisch-pfälzischen Nephrologenkongreß im Jahre 2000 wurde mit einem Posterpreis ausgezeichnet):

Thijssen S, Sester U, Sester M, van Bentum K, Gärtner BC, Köhler H (2000) Rapid Whole Blood T-Cell Assay to Quantify the Effect of Immunosuppressive Drugs *in vivo*. Congress of Nephrology, Wien, Österreich; 02.-05.09.2000

Thijssen S, Sester U, Sester M, Gärtner BC, Girndt M, Köhler H (2000) Antigenspezifischer T-Zellassay zur direkten Analyse der Wirkung von Immunsuppressiva auf die zelluläre Immunantwort des Menschen. XLIV. saarländisch-pfälzischer Internistenkongreß, Saarbrücken, Deutschland; 10.-11.03.2000

Sester U, **Thijssen S**, van Bentum K, Sester M, Köhler H (2003) Rapid Assay to Identify Direct Alloreactivity for the Application in Clinical Transplantation. 11th Congress of the European Society for Organ Transplantation, Venedig, Italien; 20.-24.09.2003

Sester U, Sester M, **Thijssen S**, van Bentum K, Girndt M, Köhler H (2001) Monitoring der Wirkstärke von Immunsuppressiva mittels Durchflußzytometrie - eine Alternative zu Spiegelbestimmungen? Tagung der Deutschen Transplantationsgesellschaft, Heidelberg, Deutschland; 22.-24.11.2001

Sester U, van Bentum K, **Thijssen S**, Girndt M, Sester M, Köhler H (2001) Interindividual Variability of the Immunosuppressive Strength of Cyclosporine A and Tacrolimus. World Congress of Nephrology, San Francisco, California, USA; 14.-17.10.2001

Van Bentum K, Sester U, **Thijssen S**, Girndt M, Sester M, Köhler H (2001) Interindividual Variability of the Immunosuppressive Strength of Cyclosporine A and Tacrolimus. 32. Kongreß der Gesellschaft für Nephrologie, Münster, Deutschland; 29.09.-02.10.2001

Sester U, **Thijssen S**, Sester M, Girndt M, Köhler H (2001) 'T-Cell Crossmatch' Assay zur Identifikation von Patienten mit direkter Alloreaktion bei Transplantation. XLV. Saarländisch-pfälzischer Internistenkongreß, Saarbrücken, Deutschland; 08.-10.03.2001

Van Bentum K, Sester U, **Thijssen S**, Girndt M, Sester M, Köhler H (2001) Individuelle Quantifizierung der Hemmbarkeit antigenspezifischer Immunantworten - Eine neue Strategie zur Dosierung von Immunsuppressiva. XLV. Saarländisch-pfälzischer Internistenkongreß, Saarbrücken, Deutschland; 08.-10.03.2001

Van Bentum K, Sester U, **Thijssen S**, Girndt M, Sester M, Köhler H (2000) Individual Susceptibility to Immunosuppressive Effects of Calcineurin Inhibitors Analyzed in Whole Blood. German and Dutch Society of Immunology, Joint Annual Meeting, Düsseldorf, Deutschland; 29.11.-02.12.2000

Sester U, Sester M, **Thijssen S**, van Bentum K, Gärtner BC, Girndt M, Köhler H (2000) Rapid Whole Blood T-Cell Assay to Quantify the Effect of Immunosuppressive Drugs *in vivo*. 33rd Annual Meeting of the American Society of Nephrology, Toronto, Ontario, Canada; 10.-16.10.2000

Sester U, Sester M, **Thijssen S**, Girndt M, Köhler H (2000) 'T-Cell Crossmatch' Assay to Identify Recipients with Direct Alloresponses in Transplantation. 33rd Annual Meeting of the American Society of Nephrology, Toronto, Ontario, Canada; 10.-16.10.2000

Sester U, **Thijssen S**, Sester M, Girndt M, Köhler H (2000) 'T-Cell Crossmatch' Assay to Identify Recipients with Direct Alloresponses in Transplantation. Congress of Nephrology, Wien, Österreich; 02.-05.09.2000

Sester U, **Thijssen S**, Sester M, Girndt M, Köhler H (2000) 'T-Cell Crossmatch' Assay zur Identifikation von Patienten mit direkter Alloreaktion bei Transplantation. Saarländisch-pfälzischer Nephrologenkongreß, Kaiserslautern, Deutschland; 2000.

Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung	1
2	Einführung	5
2.1	Organtransplantation und Organabstoßung	5
2.1.1	Die direkte Abstoßung	6
2.1.2	Die indirekte Abstoßung	6
2.2	Maßnahmen zur Verbesserung des Transplantüberlebens	7
2.3	Die Immunsuppression	8
2.3.1	Glukokortikoide	8
2.3.2	Proliferationshemmer	9
2.3.3	TOR-Inhibitoren (Sirolimus; Everolimus)	10
2.3.4	FTY720	10
2.3.5	Calcineurin-Inhibitoren (Cyclosporin und FK506)	10
2.3.6	Antikörper	11
2.4	Die Problematik der Immunsuppression	12
2.5	Woran orientiert man sich bei der Einstellung der Immunsuppression?	13
2.6	Einschätzung des Risikos akuter Abstoßung	14
2.7	Ziele der Arbeit	15
3	Material und Methoden	17
3.1	Verwendete Abkürzungen	17
3.2	Geräte und Verbrauchsmaterialien	19
3.3	Antikörper, Stimulanzen und Kostimulanzen	20
3.4	Zusammensetzung von Zellkulturmedium und FACS-Puffer	21
3.5	Übrige Reagenzien / Substanzen	22

3.6	Isolierung, Lagerung und Zählung von Zellen.....	22
3.6.1	PBMC-Isolierung mittels Dichtezentrifugation	22
3.6.2	Einfrieren von PBMC in flüssigem Stickstoff und Auftauen von gefrorenen PBMC	23
3.6.3	Zellzählung	24
3.7	Stimulationsmethoden und Fixierung.....	25
3.7.1	Vollblutstimulation.....	25
3.7.2	Fixierung von Vollblutansätzen	26
3.7.3	Stimulation von PBMC.....	27
3.7.4	Fixierung von PBMC.....	27
3.7.5	Immunsuppressiva-Spiegeleinstellung <i>in vitro</i>	27
3.7.6	Allospezifische Stimulation mit PBMC <i>in vitro</i>	28
3.8	Färbetechniken.....	29
3.8.1	Permeabilisierung und intrazelluläre Zytokinfärbung	29
3.8.2	Herstellung der Färbeansätze für die Nachfärbung fixierter Zellen	29
3.9	Software	30
3.10	Statistische Auswertung.....	30
4	Ergebnisse.....	31
4.1	IFN γ , IL-2, IL-4 und IL-10 werden bereits innerhalb der ersten sechs Stunden nach Stimulationsbeginn exprimiert.....	31
4.2	Durch Cyclosporin A bzw. FK506 läßt sich die Induktion von IFN γ und IL-2 dosisabhängig bei klinisch relevanten Konzentrationen hemmen	33
4.3	IL-4 und IL-10 werden auch in unstimulierten T-Zellen exprimiert. Eine Senkung unter dieses Basisniveau war nicht nachzuweisen.....	35
4.4	CsA und FK506 verringern dosisabhängig die IFN γ -Expressionsstärke auf Einzelzellniveau.....	37

4.5	Detektion der T-zellvermittelten Monozytenlyse als Parameter für die zytotoxische T-Zellaktivität	38
4.5.1	Mit zunehmender Stimulationsdauer sinkt der Anteil der Monozyten im Ansatz	39
4.5.2	CsA und FK506 hemmen dosisabhängig die Fähigkeit zytotoxischer T-Zellen zur Monozytenlyse.....	40
4.6	Charakterisierung der Dosis-Wirkungs-Beziehungen für Cyclosporin A und FK506.....	41
4.6.1	Dosis-Wirkungs-Beziehung für Cyclosporin A und FK506.....	42
4.6.2	FK506 besitzt eine höhere molare Wirkstärke als Cyclosporin A. Das Wirkprofil der beiden Calcineurin-Inhibitoren unterscheidet sich außerdem je nach verwendetem Stimulans	43
4.7	Auch nach in vivo eingestellten CsA- und FK506-Spiegeln läßt sich mit dem verwendeten Kurzzeit-Assay die Hemmung der IFN γ - und IL-2-Induzierbarkeit nachweisen	44
4.8	Alloreaktive T-Zellen lassen sich innerhalb von sechs Stunden mittels Durchflußzytometrie nachweisen	45
4.9	Die gemessene Alloreaktivität ist nicht durch unspezifische Bystander-Aktivierung beeinflusst.....	47
4.10	Zirkulierende, präformierte alloreaktive T-Zellen finden sich vornehmlich in der Population der CD8-positiven T-Zellen	48
4.11	Die Anzahl der HLA-Mismatches kann keine Aussage über die direkte Alloreaktivität im Einzelfall treffen	49
5	Diskussion	51
6	Literaturverzeichnis	61
7	Danksagung	67
8	Lebenslauf	68

1 Zusammenfassung

Auf dem Gebiet der Transplantationsmedizin sind in den vergangenen Jahrzehnten beachtliche Fortschritte erzielt worden. Das stetig wachsende Wissen um immunologische Zusammenhänge, die Entwicklung neuer immunsuppressiver Substanzen und die studienbasierte Entwicklung neuer immunsuppressiver Regime führen zu immer längerem Transplantatüberleben im Empfänger bei gleichzeitig verbessertem Nebenwirkungsprofil. Ein genereller Verzicht auf die Suppression des adaptiven Immunsystems ist jedoch zum gegenwärtigen Zeitpunkt noch nicht realisierbar. Die Entdeckung und Einführung der Calcineurin-Inhibitoren Cyclosporin A und FK506 waren Meilensteine der Transplantationsmedizin, und diese Substanzen sind die Eckpfeiler der immunsuppressiven Basistherapie in der modernen Nierentransplantation. Calcineurin-Inhibitoren besitzen jedoch eine geringe therapeutische Breite. Die unspezifische Suppression des adaptiven Immunsystems bringt die Gefahr bedrohlicher Infektionen und eines gesteigerten Malignomrisikos mit sich. Hinzu kommen Immunsuppressiva-Toxizitäten, die bei stetig wachsender Expositionsdauer der transplantierten Patienten zunehmend zum Tragen kommen. Daher muß das Ziel die Minimierung der verabreichten Immunsuppression auf das absolut notwendige Maß sein. Auf der anderen Seite kann eine Unterimmunsuppression eine Organabstoßung und potentiell einen Organverlust nach sich ziehen. Daher ist eine engmaschige klinische, laboranalytische und ggf. histologische Kontrolle zur Überwachung der verabreichten Immunsuppression unabdingbar. Im Falle der Calcineurin-Inhibitoren bedient man sich zur laboranalytischen Überwachung der Bestimmung der Substanzspiegel im Vollblut des Patienten. Allerdings sind Cyclosporin A und FK506 Substanzen mit komplexer Biodistribution, und ihre immunologische Wirkung hängt von einer Vielzahl von Faktoren ab, unter anderem dem Hämatokritwert, der Verfügbarkeit von Plasmaproteinen, der verabreichten Komedikation, und nicht zuletzt gibt es Hinweise auf eine interindividuell unterschiedliche Suszeptibilität der T-Zellen gegenüber Calcineurin-Inhibitoren. All dies entzieht sich der Vollblut-Spiegelbestimmung, und das Zusammenspiel dieser Faktoren ist in der Theorie kaum vorherzusagen, so daß die empirischen Richtwerte für die angestrebten Spiegel nicht in jedem Falle der individuellen Situation des Patienten gerecht werden. Anstelle der Spiegelbestimmung, beziehungsweise ergänzend dazu, wäre eine Methode zur Quantifizierung der tatsächlichen immunologischen Wirkstärke von Calcineurin-Inhibitoren von Interesse. Wir etablierten und charakterisierten einen solchen Assay, der sich der durchflußzytometrischen Analyse induzierter Zytokinantworten bedient. Ausleseparameter ist die IFN γ -Induktion in T-Zellen nach CMV-Antigen- bzw. Staphylokokken-Enterotoxin-B-Stimulation über sechs Stunden. Es zeigte sich eine deutlich dosisabhängige und reproduzierbar quantifizierbare Reduktion reaktiver T-Zellen durch die Calcineurin-Inhibitoren Cyclosporin A und FK506, sowohl *in vitro* als auch *ex vivo*. Die kurze Stimulationsdauer gestattet zudem den Einsatz in klinischem Rahmen. Im Falle der Organtransplantation wäre es darüber hinaus von Bedeutung, das präformierte alloreaktive Potential einer gegebenen

Spender-Empfänger-Konstellation vor der Transplantation zu kennen, um den individuellen Bedarf an Immunsuppression einschätzen zu können. Im zweiten Teil der Arbeit wird ein durchflußzytometrischer Kurzzeit-Assay zur Identifizierung direkt alloreaktiver T-Zellen nach PBMC-Stimulation vorgestellt. Durch *in-vitro*-Vorfärbung der Spenderzellen mit einem monoklonalen Antikörper gegen den Panleukozyten-Marker CD45 lassen sich Spender- und Empfängerzellen auf einfache Weise unterscheiden. Gleichzeitig entfällt durch die kurze Stimulationsdauer von lediglich sechs Stunden die Notwendigkeit zum Abtöten der Spenderzellen, ohne daß die Ergebnisse durch unspezifische Bystander-Aktivität verfälscht werden. Hierdurch kann im selben Schritt Alloreaktivität sowohl in Host-versus-Graft- als auch Graft-versus-Host-Richtung bestimmt werden. Zusammengenommen eröffnen die beiden in dieser Arbeit vorgestellten Methoden interessante Möglichkeiten, neue Einblicke in die Wirkung von Immunsuppressiva *in vivo* und die Mechanismen der Allotransplantatabstoßung zu gewinnen. Darüber hinaus liefern sie wertvolle Hilfsmittel für prospektive Studien mit dem Ziel, die Individualisierung der immunsuppressiven Therapie voranzutreiben und diese damit für den Patienten effizienter und sicherer zu machen.

Summary

Over the past decades, considerable progress has been made in the field of solid organ transplantation. The constantly growing knowledge of immunologic mechanisms, the development of novel immunosuppressive agents and the evidence based design of new immunosuppressive treatment strategies yield longer organ half-lives and reduced unfavorable side effects. All available immunosuppressive drugs, however, unselectively compromise the adaptive immune system as a whole, and to date, complete withdrawal of immunosuppression is not feasible. The discovery of the calcineurin inhibitors cyclosporine A (CsA) and tacrolimus (FK506) turned out to be a major breakthrough in transplantation medicine, and these substances now represent the mainstay of prevention of allograft rejection. They do, however, have relatively narrow therapeutic indices. The unspecific suppression of adaptive immunity entails exposing the patient to a state of increased risk for infectious complications and malignancy. In addition, drug-related toxicity becomes a growing issue of interest with continuing improvement in transplantation outcomes. Therefore, the therapeutic goal is to target immunosuppression to the lowest dose possible that will still provide protection against graft rejection. This balance is difficult to accomplish and requires close-meshed clinical, laboratory and, where appropriate, histologic monitoring of the patient. As for the calcineurin inhibitors, measurement of trough levels from lysed whole blood by means of specific antibodies is the common method utilized for laboratory monitoring by most centers. However, cyclosporine and tacrolimus have a complex biodistribution, and their immunologic effects depend on various factors including hematocrit, concentration of plasma proteins, concomitant use of other drugs, and there is evidence for substantial interindividual variation in susceptibility to the immunosuppression exerted by calcineurin inhibitors. None of this is covered by the determination of whole blood drug levels, and the interaction of these factors with regard to the net immunosuppressive effect can hardly be anticipated based on theoretical considerations alone. Thus, empirically guided recommendations for target ranges of drug levels can only roughly approximate an individual patient's need for immunosuppression. Complementing the determination of drug levels, it would be of interest to directly quantify the actual immunosuppressive effect of the substance. In this thesis we introduce a whole blood assay designed for rapid quantitation of the effects of calcineurin inhibitors both *in vitro* and *ex vivo*. The method is based on flow cytometric analysis of induced cytokine responses (preferably IFN γ) in T cells after six hours of antigen specific (CMV antigen) or super-antigen (SEB) stimulation. The assay elicits a dose-dependent, sigmoid dose-response-curve for the inhibitory effect of CsA and tacrolimus on IFN γ -induction with the greatest changes in inhibition occurring at the drug concentrations empirically used in solid organ transplantation. The short stimulation time allows for clinical applicability. Moreover, in the setting of organ transplantation, it would be of importance to know the extent of preformed alloreactive T cell immunity in a given donor-recipient-constellation. This would guide in estimating the risk for acute rejection and might also prove useful for tailoring the immunosuppressive regimen to the individual situation. The second part of this thesis

introduces a flow cytometric assay that allows for rapid identification of preformed alloreactive CD4 and CD8 positive T cells after as little as six hours of PBMC stimulation, again suggesting itself for use in a clinical setting. Utilizing *in vitro* prestaining of donor cells with a monoclonal antibody directed against the leukocyte marker CD45, donor and recipient cells can readily be differentiated, replacing laborious procedures aimed at mortalizing the donor cell population prior to stimulation. Furthermore, the short stimulation time precludes unspecific bystander activation from altering the results. In combination, this allows for simultaneous detection of both host-versus-graft as well as graft-versus-host reactivity, which may be of additional interest if the assay were to be applied in the setting of stem-cell transplantation. Taken together, the two assays described in this thesis provide the opportunity for gaining new insight into the *in vivo* effects of immunosuppressive drugs and the nature of allograft rejection. Likewise, they may prove useful tools for prospective studies aimed at further customizing immunosuppressive therapy to the individual patient's needs, thereby adding both efficiency and safety to these regimens.

2 Einführung

2.1 Organtransplantation und Organabstoßung

Zahlreiche Erkrankungen, infektiöser wie auch nichtinfektiöser Ätiologie, gehen mit einer Destruktion von Organen oder Organsystemen einher. In vielen Fällen stellt eine Organtransplantation die einzige Möglichkeit dar, Lebenserwartung und Lebensqualität der betroffenen Patienten auf lange Sicht zu verbessern. Viele lebenswichtige Organe, darunter Nieren, Knochenmark, Herz, Leber und Lungen, können heutzutage mit Hilfe der Transplantationsmedizin verpflanzt werden, jedoch übersteigt der Bedarf an Organen nach wie vor bei weitem das Angebot (COHEN, PERSIJN, 2004). Darüber hinaus kann eine Organabstoßungsreaktion mit potentielltem Organverlust für den betroffenen Patienten weitreichende körperliche, psychische und soziale Folgen nach sich ziehen. Nicht zuletzt stellen solche Komplikationen durch die notwendige Hospitalisierung mit intensiver medizinischer Betreuung auch einen erheblichen Kostenfaktor dar. Dies sind einige der Gründe für das Bestreben der Humanmedizin, das Überleben des Transplantates im Empfänger zu verbessern und nach Möglichkeit eine lebenslange, gute Organfunktion im Empfänger zu realisieren. Einen Hauptgrund für das Fehlschlagen dieser Bemühung stellen Abstoßungsreaktionen dar (BRAUN, 2003). Abstoßungsreaktionen können vom Immunsystem des Empfängers ausgehen und gegen das Transplantat gerichtet sein, sie können in selteneren Fällen auch, je nach Art des transplantierten Organs in unterschiedlichem Ausmaße, von zusammen mit dem Organ transplantierten immunkompetenten Zellen des Organspenders ausgehen und gegen den Organismus des Empfängers gerichtet sein (sog. graft versus host disease). Die Zellen des Immunsystems interagieren untereinander und mit anderen Zellen des Körpers in Form eines komplexen Netzwerkes, teils über unmittelbare Interaktion, teils über Mediatoren, die Zytokine. Abstoßungsreaktionen können nach verschiedenen Kriterien eingeteilt werden, wobei jedoch *in vivo* eine scharfe Trennung nicht immer möglich ist. Teilt man die Abstoßungen nach zeitlichen Kriterien ein, so kann man hyperakute, akute und chronische Abstoßungen unterscheiden. Ausgehend von der Pathogenese unterscheidet man humorale von zellvermittelten Abstoßungsreaktionen. Die hyperakute Abstoßung ist vornehmlich humoral bedingt. Binnen Minuten kommt es auf Grund präformierter Antikörper gegen HLA- oder Blutgruppenantigene des Sponders zu einer intravasalen Koagulation und Komplementaktivierung im Transplantat mit einer massiven hämorrhagischen Infarzierung (BRAUN, 2003). Die chronische Abstoßung ist multifaktoriell bedingt. An ihr sind neben der sich entwickelnden Sekretion alloreaktiver Antikörper durch aktivierte B-Lymphozyten und der T-Zell-vermittelten Komponente auch Faktoren wie makrophagenvermittelte Entzündungs- und Umbauprozesse, aber auch Immunsuppressivtoxizitäten oder Virusreaktivierungen beteiligt (SUTHANTHIRAN, STROM, 1994). Da hier neben der Abstoßung im immunologischen Sinne auch andere Faktoren an der progredienten Schädigung des

Transplantates beteiligt sind, wird der Prozeß häufig auch als chronisches Transplantatversagen bezeichnet. Die akute Abstoßung hingegen ist primär T-zellvermittelt (SUTHANTHIRAN, STROM, 1994). Sie kann nach ihrem Pathomechanismus wiederum in zwei weitere Untergruppen gegliedert werden, die direkte und die indirekte Abstoßung.

2.1.1 Die direkte Abstoßung

Bei der direkten Abstoßung erkennen T-Zellen des Empfängers direkt MHC:Peptid-Komplexe auf antigenpräsentierenden Zellen (APC) des Spenders. Eine Möglichkeit hierbei ist, daß es sich dabei um Fremd-MHC-Moleküle auf den Spender-APC handelt. Eine Zeit lang bestand Unklarheit darüber, ob diese alloreaktiven T-Zellen eine eigene Subpopulation von T-Zellen darstellen, die sich der Positivselektion im Thymus entzogen haben, doch inzwischen besteht weitestgehend Einigkeit darüber, daß diese alloreaktiven T-Zellen des Empfängers sehr wohl selbst-MHC restringiert sind, jedoch über den Mechanismus der Kreuzreaktivität auch fremd-MHC Moleküle binden können (HEEGER, 2003). Der Peptid:MHC-Komplex als Ganzes ist entscheidend für eine mögliche Bindung und konsekutive Aktivierung einer T-Zelle, so daß auf Grund der Kombination aus (a) der Vielfalt des T-Zell-Rezeptorrepertoires, (b) der hohen Zahl an verschiedenen Fremd-MHC:Peptid-Komplexen auf einem Transplantat und (c) der relativ geringen Affinität des T-Zellrezeptors zu seinem MHC:Peptid-Liganden bis zu 10% eines individuellen TCR-Repertoires Alloreaktivität aufweist (HEEGER, 2003). Je nachdem, ob hierbei das Peptid oder das Fremd-MHC-Molekül führend für die Stärke der Interaktion mit dem T-Zellrezeptor ist, spricht man von peptid- oder MHC-dominanter Bindung. In der Tat gelang der Nachweis von T-Zellen, die bestimmte Allo-MHC-Moleküle unabhängig von dem darin gebundenen Peptid erkennen können (SMITH, LUTZ, 1997). Auch wenn Spender und Empfänger MHC-identisch sind, besteht die Möglichkeit der direkten Alloantigenerkennung, indem die Spender-APC donorspezifische Peptide präsentieren, die im Empfängerorganismus nicht vorkommen (HEEGER, 2003). Man spricht hierbei von Minor-Histokompatibilitäts-Antigenen (minor-H-Antigenen). Auf die Aktivierung der T-Zellen folgt deren Proliferation und Differenzierung mit Aufnahme ihrer Effektorfunktionen.

Man muß beachten, daß der soeben beschriebene Mechanismus der direkten Abstoßung nicht den physiologischen Weg der Antigenerkennung darstellt. Physiologischerweise erfolgt die Ausbildung einer Immunreaktion gegen Fremdanigene über den im folgenden beschriebenen Mechanismus, der, bezieht er sich auf ein transplantiertes Organ, als indirekte Abstoßung bezeichnet wird.

2.1.2 Die indirekte Abstoßung

Hierbei werden Alloantigene von antigenpräsentierenden Zellen des Empfängers phagozytiert, prozessiert und im Lymphknoten den T-Zellen präsentiert (HEEGER, 2003). Diese proliferieren daraufhin, differenzieren und nehmen ihre Effektorfunktionen auf. Auch die

indirekte Abstoßung umfaßt die Präsentation sowohl von spenderspezifischen minor-H-Antigenen als auch von Peptiden, die aus Fremd-MHC-Molekülen des Spenders stammen.

Beide Formen, die direkte wie auch die indirekte Abstoßung, beziehen über Zell-Zell-Interaktionen und über Sekretion von Zytokinen immer auch andere Arten von Immunzellen in die Reaktion mit ein, so daß es im Normalfall keine isolierte T-Zell-, B-Zell- oder Makrophagen-Abstoßung gibt. Auch läuft *in vivo* nicht entweder eine direkte oder eine indirekte Abstoßung ab, sondern stets beide, wenn auch mit unterschiedlichen Kinetiken. Die Unterscheidung in diese beiden Formen der Abstoßungsvermittlung ist aber dennoch sinnvoll. Sie stellen zwei alternative, wenn auch parallel ablaufende, Mechanismen der Initiierung von Alloreaktionen dar. Und betrachtet man die akute Abstoßung und das chronische Transplantatversagen, so scheinen die direkte und die indirekte Alloantigenerkennung unterschiedlichen Anteil an deren Entstehung und Ausmaß zu haben (HEEGER, 2003). Auch im Hinblick auf Tests zur Quantifizierung von Alloreaktivität ist diese Unterscheidung von Bedeutung. Zur Beurteilung der Testaussage ist es wichtig zu wissen, welchen Arm der Alloantigenerkennung der verwendete Test untersucht. So läßt beispielsweise eine ausgeschlossene direkte Alloreaktivität keine Aussage über die Entwicklung oder Schwere einer möglichen Abstoßung über den Weg der indirekten Alloantigenerkennung zu.

2.2 Maßnahmen zur Verbesserung des Transplantüberlebens

Neben Maßnahmen wie beispielsweise Verbesserung der chirurgischen Techniken und Verkürzung der Ischämiezeiten, lag das Augenmerk zunächst hauptsächlich auf der HLA-Kompatibilität von Spender und Empfänger. Nachdem man erkannt hatte, daß eine Verschiedenheit von Spender- und Empfänger-MHC-Molekülen ein ganz entscheidender Faktor in der Auslösung von Abstoßungsreaktionen bei Allotransplantaten ist, versuchte man, durch HLA-Typisierung ein möglichst exaktes Übereinstimmen von Spender und Empfänger in diesem Bereich zu gewährleisten. Die HLA-Typisierung, serologisch oder zunehmend auch mittels PCR, ist heute eine Standardbestimmung vor der Nierentransplantation, und es hat sich gezeigt, daß dadurch auf Populationsbasis das Überleben des Transplantates verlängert und die Häufigkeit und Stärke von Alloreaktionen gesenkt werden kann (OPELZ, 1991; OPELZ et al., 1991). Eine exakte HLA-Übereinstimmung ist jedoch in der Praxis selten möglich. Dies liegt nicht zuletzt auch daran, daß die menschlichen MHC-Moleküle zum einen polygen und zum anderen sehr polymorph sind, so daß eine Übereinstimmung praktisch nur bei Geschwistern möglich ist. Auch wenn sich zwei Probanden über eine serologische oder molekularbiologische Typisierung als HLA-identisch herausstellen, so besitzen sie meist dennoch nicht exakt denselben HLA-Genotyp. Es können Unterschiede auf Nukleotidebene vorliegen, die mit den Standardmethoden der Typisierung nicht registriert werden (BAXTER-LOWE et al., 1992; SANTAMARIA et al., 1994). Außerdem deckt die HLA-Typisierung vor Transplantationen nicht das gesamte Spektrum der HLA-Moleküle ab (z.B. HLA-C, HLA-DQ

etc.). Ein weiteres Problem liegt darin, daß selbst bei Geschwistern mit identischem HLA-Genotyp eine Variabilität in den sogenannten Minor-Histokompatibilitäts-Antigenen eine Abstoßung des Allotransplantates induzieren kann (BERGER et al., 1994; MENDOZA et al., 1997). Aus diesen Gründen ist bis heute der Verzicht auf ein wesentliches Konzept der Transplantationsmedizin noch nicht möglich: Die Immunsuppression.

2.3 Die Immunsuppression

In der Transplantationsmedizin werden verschiedene immunsuppressive Strategien angewandt, um einer Transplantatabstoßung vorzubeugen bzw. dennoch aufgetretene Abstoßungen in den Griff zu bekommen. Die Kombination von Immunsuppressiva ist die Regel. Hierbei werden Substanzen mit unterschiedlichen Wirkmechanismen und unterschiedlichen Nebenwirkungsspektren parallel eingesetzt. Dadurch wird eine Summation bzw. Potenzierung der immunsuppressiven Gesamtwirkung bei gleichzeitiger Streuung der Nebenwirkungen und der Toxizität erreicht. Das Spektrum der verwendeten Substanzen ist breit, die wichtigsten Vertreter sollen im folgenden kurz vorgestellt werden.

2.3.1 Glukokortikoide

Steroide erzeugen eine Vielzahl von Effekten, wobei die immunsuppressiven Eigenschaften grob unterteilt werden können in Effekte auf 1) Zellpopulationen, 2) Zytokine, 3) induzierbare NO-Synthase und 4) Transkriptionsfaktoren. Glukokortikoide bewirken eine Umverteilung von Lymphozyten und Monozyten von der peripheren Zirkulation ins Knochenmark (FAUCI, 1975), wodurch weniger immunkompetente Zellen im peripheren Kreislauf für die Initiierung und Vermittlung von Alloreaktivität zur Verfügung stehen. Weiterhin führen Glukokortikoide zu einer Verschiebung der T-zellulären Antwort vom Th1-Typ in Richtung Th2-Typ, so daß vermehrt Zytokine wie IL-4 und IL-10 produziert werden, die mit Transplantatakteptanz in Verbindung gebracht werden (DAYNES, ARANEO, 1989). Die Funktion von NK-Zellen wird durch Glukokortikoide eingeschränkt (GONZALO et al., 1993), und die Apoptose-Induktion in reifen T-Zellen ist beschrieben (ZUBIAGA et al., 1992). Glukokortikoide hemmen die Induktion einer Reihe von Zytokinen, die vornehmlich von Monozyten und Makrophagen produziert werden (IL-1, IL-6, TNF- α , RANTES) (CHENSUE et al., 1991) und auch die IFN γ - und IL-2-Induktion in CD4-positiven T-Helferzellen (VACCA et al., 1992). Für hohe Dosen von Glukokortikoiden konnte nach intraarterieller Injektion im Rattenmodell eine Hemmung der IL-2-Rezeptor-Expression gezeigt werden (RUERS et al., 1987), und die Expression von MHC-Klasse-II-Antigenen wird unter immunsuppressiver Medikation mit Glukokortikoiden *in vivo* inhibiert (MADSEN et al., 1981). Daneben führen Glukokortikoide zu einer vermehrten Produktion von TGF- β , welches immunsuppressive Effekte vermittelt (AYANLARBATUMAN et al., 1991). Die Induktion der mRNA-Transkription von induzierbarer NO-Synthase (iNOS) kann durch Glukokortikoide gehemmt werden (WORRALL et al., 1996). Da Stickoxid, welches

im Rahmen der Abstoßung von Herz-Allotransplantaten durch iNOS produziert wird, mit der Destruktion von Myozyten assoziiert ist, und da sich durch iNOS-Hemmung mittels Aminoguanidin eine Milderung des Abstoßungsverlaufes erzielen läßt, ist davon auszugehen, daß die Inhibition von iNOS einen weiteren immunsuppressiven Mechanismus von Glukokortikoiden darstellt. Für Glukokortikoide ist eine Hemmung der Transkriptionsfaktoren AP-1 und NF- κ B gezeigt. In unstimulierten Zellen ist NF- κ B im Zytoplasma mit I κ -B α assoziiert. Immunstimulation der Zelle führt zur Phosphorylierung des I κ -B α -Proteins, was zu dessen Abspaltung von NF- κ B führt, wodurch NF- κ B wiederum in den Zellkern translozieren und dort seine Zielgene aktivieren kann. Unter dem Einfluß von Glukokortikoiden jedoch steigt die intrazelluläre I κ -B α -Konzentration an und wirkt damit der Wanderung von NF- κ B in den Zellkern und der Transkription verschiedener Zytokingene entgegen (AUPHAN et al., 1995; MARX, 1995).

2.3.2 Proliferationshemmer

Azathioprin

Azathioprin (AZA) ist das Nitroimidazol-Derivat von 6-Mercaptopurin. AZA wird *in vivo* in einen Purinantagonisten umgewandelt, der störend in die Nukleinsäuresynthese eingreift und damit seine stärkste pharmakologische Wirkung in sich teilenden Geweben entfaltet. AZA wird zu 6-Thioinosinsäure metabolisiert, welches mit Inosinmonophosphat konkurriert und so die Synthese von Adenosin- und Guanosinmonophosphat und damit auch die DNA-Synthese hemmt (JANEWAY et al., 2002). Kürzlich konnte darüber hinaus gezeigt werden, daß AZA ein über CD28-vermitteltes kostimulatorisches Signal via Blockade der CD28-abhängigen Rac1-Aktivierung in ein Apoptose-Signal umwandelt (TIEDE et al., 2003).

Mycophenolat Mofetil

Mycophenolat Mofetil (MMF) wird *in vivo* zügig zu Mycophenolsäure (mycophenolic acid, MPA) hydrolysiert. MPA inhibiert das Enzym Inosinmonophosphat-Dehydrogenase, ein Schlüsselenzym der de novo Purinsynthese (EUGUI, ALLISON, 1993). Daraus folgt eine Hemmung der klonalen Expansion von T- und B-Lymphozyten.

Dihydroorotat-Dehydrogenase-Inhibitoren

Leflunomid inhibiert das Enzym Dihydroorotat-Dehydrogenase, ein Schlüsselenzym der Pyrimidinsynthese. Der aktive Leflunomid-Metabolit A77 1726 wurde modifiziert und befindet sich unter der Bezeichnung FK778 in Phase-2-Studien in der Nierentransplantation (HALLORAN, 2004).

2.3.3 TOR-Inhibitoren (Sirolimus; Everolimus)

Sirolimus (Rapamycin) und Everolimus binden an das FK-bindende Protein 12 (FKBP12), der Komplex hieraus bindet und inhibiert das Protein mTOR (mammalian target of rapamycin, auch FRAP oder RAFT genannt), jedoch nicht Calcineurin (HALLORAN, 2004). Die TOR-Hemmung unterbindet das 3. Signal der T-Zellaktivierung, indem die IL-2-rezeptorvermittelte Aktivierung des Zellzyklus blockiert wird (HALLORAN, 2004).

2.3.4 FTY720

FTY720 ist ein Sphingosin-Analog, welches nach Phosphorylierung an lymphozytäre Sphingosin-1-Rezeptoren bindet. Dort agiert es als funktioneller Sphingosin-1-Rezeptor-Antagonist und nimmt Einfluß auf die Lymphozytenwanderung (BRINKMANN et al., 2004). FTY720 bewirkt eine Verlagerung von T-Zellen in lymphoide Gewebe und unterdrückt ihre Abwanderung in das Transplantat. FTY720 befindet sich aktuell in Phase-3-Studien in der Nierentransplantation.

2.3.5 Calcineurin-Inhibitoren (Cyclosporin und FK506)

Cyclosporin A (CsA; $C_{44}H_{111}N_{11}O_{12}$; Molekulargewicht 1203) ist ein hoch lipophiles, zyklisches Dekapeptid aus dem Pilz *Tolypocladium inflatum* GANS. Seine klinische Einführung 1983 brachte eine überzeugende Steigerung des Ein- bis Zwei-Jahresüberlebens allogener Lebertransplantate von ca. 55% auf etwa 85% mit sich, leider jedoch keine vergleichbare Steigerung des Langzeitüberlebens (BRAUN, 2003). FK506 (Tacrolimus; $C_{44}H_{69}NO_{12} \cdot H_2O$; Molekulargewicht 804) ist ein hoch lipophiles Makrolid-Lakton-Antibiotikum aus *Streptomyces tsukubaensis*. Die ersten Ergebnisse aus *in vitro* Versuchen und Transplantatexperimenten aus Tiermodellen wurden 1987 veröffentlicht (KINO et al., 1987a; KINO et al., 1987b; OCHIAI et al., 1987). Im April 1994 wurde FK506 in den USA zur Verhinderung von Leber-Allotransplantat-Abstoßungen zugelassen und in der Folgezeit der Einsatzbereich auf die Transplantation anderer Organe ausgedehnt (ELLIS, 1995; LASKOW et al., 1998). Die Calcineurin-Inhibitoren entfalten ihre Wirkung über die intrazytoplasmatische Bindung an Proteine, die unter dem Begriff Immunophiline subsummiert werden (BRAM et al., 1993). Für Cyclosporin sind dies die Cyclophiline, wobei Cyclophilin A das in T-Zellen überwiegende Cyclophilin ist. Für Tacrolimus sind es die FK-bindenden Proteine (FKBP). Hier spielt FKBP12 die größte Rolle. Die Bindung der Calcineurin-Inhibitoren an ihr Immunophilin erhöht die Affinität des Immunophilins zu Calcineurin, der Komplex aus Calcineurin-Inhibitor und Immunophilin bindet Calcineurin und hemmt dadurch die Aktivierung dieses Enzyms, welches eine wichtige Aufgabe in der Signaltransduktion von T-Lymphozyten wahrnimmt (CARDENAS et al., 1994; CARDENAS et al., 1995). Calcineurin ist eine Serin-Threonin-Phosphatase, die normalerweise aktiviert wird durch eine Erhöhung des intrazellulären Kalziumspiegels, wie er als Folge des TCR-Crosslinking nach Erkennung eines MHC:Peptid-

Komplexes auf einer antigenpräsentierenden Zelle entsteht. Daraufhin dephosphoryliert sie im Zytoplasma den Transkriptionsfaktor NFAT (nuclear factor of activated T cells), dem es dadurch möglich wird, in den Zellkern zu translozieren und dort an einen weiteren Transkriptionsfaktor, AP1, zu binden (FLANAGAN et al., 1991; NORTHROP et al., 1994; SHAW et al., 1995; LOH et al., 1996; TIMMERMAN et al., 1996). Unter den Faktoren der NFAT-Familie sind NFAT1, NFAT2 und NFAT4 an der Transkription von IL-2, IL-4 und CD40L beteiligt (RAO et al., 1997). Der Komplex aus Calcineurin-Inhibitor und Immunophilin bindet und inhibiert Calcineurin, wodurch dessen Bindung und Aktivierung von NFAT unterdrückt wird (JOHANSSON, MOLLER, 1990; HENDERSON et al., 1991).

2.3.6 Antikörper

Polyklonale Antikörper

Seit Ende der sechziger Jahre wurden verschiedene Präparationen von Antilymphozyten- und Antithymozytenglobulin (ALG; ATG) in der Nierentransplantation eingesetzt. Diese polyklonalen Antikörper werden in Pferden oder Hasen durch wiederholte Immunisierung gegen humane lymphoide Zelllinien gewonnen und anschließend aufgereinigt. Sie binden *in vivo* an zirkulierende Lymphozyten und bewirken deren Umverteilung und vorübergehende Sequestrierung in Knochenmark und möglicherweise andere Organe des retikuloendothelialen Systems. In geringem Umfang mag auch eine Zerstörung der gebundenen Lymphozyten über Antikörper-abhängige zelluläre Toxizität (Markierung für den Angriff durch Makrophagen oder NK-Zellen) vermittelt werden (JANEWAY et al., 2002; BRAUN, 2003).

Monoklonale Antikörper

Muromonab-CD3 (OK-T3)

OK-T3 ist ein IgG_{2a} Antikörper gegen die ϵ -Kette des T-Zellrezeptor-assoziierten CD3-Komplexes (1985). Die vermittelten Wirkungen umfassen Depletion, Umverteilung ins Knochenmark und funktionelle Alteration der gebundenen T-Zellen (BRAUN, 2003; HALLORAN, 2004).

Alemtuzumab (Campath 1H)

Alemtuzumab (Campath 1H) ist ein humanisierter monoklonaler Antikörper gegen CD52, der zu einer ausgeprägten T- und B-Zelldepletion führt (BRAUN, 2003; HALLORAN, 2004). In einer Studie mit 31 Nieren-Allotransplantat-Empfängern zeigte sich bei einer mittleren Nachbeobachtungszeit von 21 Monaten nach initialer Campath 1H Therapie selbst unter

niedrigdosierter Cyclosporin-Monotherapie eine vergleichbare Effektivität wie bei konventioneller Tripel-Therapie (CALNE et al., 1999).

Rituximab

Rituximab, ein monoklonaler Antikörper gegen CD20, eliminiert effektiv B-Zellen. Plasmazellen sind zwar in der Regel CD20-negativ, jedoch sind sie meist kurzlebig und werden aus CD20-positiven Vorläufern regeneriert (HALLORAN, 2004). Da CD20-positive B-Zellen als sekundäre antigenpräsentierende Zellen fungieren können, mag Rituximab einen hemmenden Einfluß auf T-Zellantworten nehmen (HALLORAN, 2004). Im Falle von schweren steroidrefraktären oder antikörpervermittelten Nierentransplantat-Abstoßungen mag Rituximab von therapeutischem Nutzen sein (BECKER et al., 2004).

Daclizumab und Basiliximab

Diese monoklonalen Antikörper gegen CD25 (α -Kette des IL-2-Rezeptors) werden in der Nierentransplantation häufig zur Induktionstherapie genutzt. Da die CD25-Expression von der T-Zellaktivierung abhängig ist, bewirken Daclizumab und Basiliximab wenig T-Zelldepletion (HALLORAN, 2004).

LEA29Y (CTLA-4-Ig)

CTLA-4-Ig ist ein Fusionsprotein, welches das zytotoxische T-Lymphozyten-assoziierte Antigen 4 (cytotoxic-T-lymphocyte-associated antigen 4, CTLA-4) mit dem Fc-Fragment von IgG kombiniert (HALLORAN, 2004). CTLA-4-Ig blockiert das kostimulatorische Signal, das durch Bindung zwischen CTLA-4 auf T-Zellen und B7.1- und B7.2-Molekülen auf antigenpräsentierenden Zellen vermittelt wird (BRAUN, 2003). Diese Blockade führt zur Hemmung einer abstoßungsfördernden Th1-Immunantwort bei gleichzeitiger Verschonung einer toleranzfördernden Th2-Antwort (SAYEGH et al., 1995).

2.4 Die Problematik der Immunsuppression

Eines ist allen derzeit verwendeten immunsuppressiven Substanzen gemeinsam: Ihre Wirkung beschränkt sich nicht auf die Immunantwort gegen die Antigene des Transplantates, sondern sie supprimieren das Immunsystem unspezifisch. Dies birgt vor allem zwei gravierende Nachteile: Die Schwächung des gesamten adaptiven Immunsystems führt zu einem Status, in dem eine Infektion des Patienten lebensgefährliche Folgen haben kann. Und nicht nur eine Neuinfektion kann diese schweren Folgen nach sich ziehen. Auch das Wiederaufkeimen einer persistierenden, vom Immunsystem bisher kontrollierten Infektion stellt eine Gefahr dar. Als Beispiel sei die CMV-Reaktivierung unter Immunsuppression genannt (BRITT, ALFORD, 1996; FISHMAN, RUBIN, 1998). Zum anderen ist das adaptive

Immunsystem ein entscheidender Faktor in der Kontrolle von Neoplasien, so daß unter generalisierter Immunsuppression das Neoplasierisiko ansteigt (PENN, 2000). Aus diesem Grunde ist die immunsuppressive Therapie eine ständige Gratwanderung. Eine Überimmunsuppression kann die eben geschilderten Folgen nach sich ziehen, eine Unterimmunsuppression kann zur Transplantatabstoßung, und damit potentiell zu irreversibler Schädigung oder gar Verlust des transplantierten Organs, führen.

2.5 Woran orientiert man sich bei der Einstellung der Immunsuppression?

Bei der Dosierung der Calcineurin-Inhibitoren dient als Meßparameter die Spiegelbestimmung der Substanzen aus Vollblut des Patienten. Die Zielspiegel beruhen hierbei auf empirisch gewonnenen Daten. So streben wir in unserer Abteilung bei der Nierentransplantation beispielsweise für Cyclosporin A (Pat. > 65J.) Talspiegel von 100-150 ng/ml während der ersten 91 Tage nach Ersttransplantation und 70-100 ng/ml in der Folgezeit bzw. für FK506 (Pat. < 65J.) 8-13 ng/ml in den ersten 91 Tagen und 5-10 ng/ml ab Tag 92 an. Es ist wichtig zu bedenken, daß es sich bei diesen Werten lediglich um Richtwerte handelt, die nicht in jedem Falle den Bedürfnissen des einzelnen Patienten gerecht werden. Einige Faktoren gestalten die Wahl des optimalen Immunsuppressivumspiegels schwierig: Die Wirkung eines bestimmten Spiegels ist von Patient zu Patient unterschiedlich, und selbst bei ein und demselben Patienten wird der gleiche Vollblutspiegel zu verschiedenen Zeitpunkten unterschiedliche Wirkung entfalten, wobei die Gründe hierfür vielfältig sind. Die gängige laboranalytische Spiegelbestimmung aus Vollblut nach Erythrozytenlyse liefert die Gesamtkonzentration der Substanz im Blut des Patienten. Immunsuppressiv wirksam ist jedoch nur der freie Anteil der Substanz. Die Immunsuppressiva Cyclosporin A und FK506 werden in hohem Maße an Blutbestandteile adsorbiert, wodurch sich der freie Anteil der Substanz verringert. Hierzu zählen zum Beispiel die Bindung an Plasmaproteine (Lipoproteine, Globuline, Albumin, etc.) und die Aufnahme in Erythrozyten (LEMAIRE, TILLEMENT, 1982; NAGASE et al., 1994), so daß auch die im Blut des Patienten verfügbare Menge an Bindungsproteinen und der individuelle Hämatokritwert die Wirkung der Calcineurin-Inhibitoren mitbestimmen. Desweiteren können parallel verabfolgte Medikamente, welche mit Cyclosporin A oder FK506 um deren Bindungsstellen konkurrieren, den freien Anteil der Substanz erhöhen und dadurch die Wirkstärke eines eingestellten Vollblutspiegels verändern. Auch läßt sich der immunsuppressive Summeneffekt mehrerer parallel verabfolgter Immunsuppressiva nicht sicher vorhersagen. Wichtig in diesem Zusammenhang ist insbesondere auch die Beobachtung einer interindividuell unterschiedlichen Suszeptibilität für die immunsuppressiven Effekte der Calcineurin-Inhibitoren, sowohl klinisch wie auch in Testsystemen *in vitro* (TSUNODA, AWEEKA, 1996; VAN DEN BERG et al., 1998a; VAN DEN BERG et al., 1998b; AHMED et al., 2001). Hinzu kommt, daß antikörperbasierte Assays zur Vollblutspiegelbestimmung mit CsA- bzw. FK506-Metaboliten kreuzreagieren können (WOO,

1994; IWASAKI et al., 1995; SCHUTZ et al., 1998; STEIMER, 1999). Einige dieser Metabolite vermitteln selbst in unterschiedlichem Ausmaße immunsuppressive Wirkungen, andere wirken nicht immunsuppressiv (FREED et al., 1991; IWASAKI et al., 1995), was die Abschätzung der tatsächlichen immunsuppressiven Gesamtwirkung des gemessenen Spiegels weiter erschwert. Die Wirkstärke der Cyclosporin-Inhibitoren kann somit aus der gängigen Spiegelbestimmung aus Vollblut nach Erythrozytenlyse immer nur grob abgeschätzt werden. Und wüßte man den exakten Spiegel der freien Substanz, so wäre selbst dann ein Rückschluß auf die individuelle Wirkung aus oben genannten Gründen nicht sicher möglich. Die Spiegelbestimmung ist somit zwar ein gutes Instrument, um Faktoren wie beispielsweise interindividuell unterschiedlich gute Resorption erkennen und ausgleichen zu können. Über die immunologische Wirkung der Substanz läßt sie jedoch keine direkte Aussage zu.

2.6 Einschätzung des Risikos akuter Abstoßung

Man ist in der Transplantationsmedizin bestrebt, möglichst kompatible Spender-Empfänger-Konstellationen zu transplantieren, das heißt, Konstellationen mit möglichst geringem Risiko für frühzeitige, schwere Abstoßungsreaktionen. Zu diesem Zweck hat man, wie oben erwähnt, erfolgreich das Konzept des HLA-Matching eingeführt. Auf diese Weise läßt sich das durchschnittliche alloreaktive Potential des Empfängers gegen den Spender (und umgekehrt) vor der Transplantation abschätzen und mit Faktoren wie der Ischämiezeit, der Art der Organspende (Lebend- oder Leichennierenspende), dem Infektionsstatus und dem Patientenalter zu einem Gesamtbild des Abstoßungsrisikos zusammenfügen. So ist es möglich, eine fundierte Entscheidung für eine bestimmte Spender-Empfänger-Konstellation zu treffen. Allerdings hat sich gezeigt, daß im Einzelfall eine Konstellation mit günstigerem Mismatch-Verhältnis durchaus eine stärkere Alloreaktion nach sich ziehen kann, während eine vermeintlich ungünstigere Konstellation mit höherer Mismatch-Zahl nicht zwangsläufig zu einer akuten Abstoßung führen muß. Nicht alleine die Anzahl, sondern auch die Immunogenität der Mismatches spielt hier also eine Rolle (CLAAS et al., 2003). Für die Transplantationsmedizin wären Testverfahren von Interesse, die das individuelle Risiko einer gegebenen Spender-Empfänger-Konstellation für eine akute Abstoßung besser einschätzen können als die HLA Typisierung alleine. Ein gängiges Laborverfahren zur Beurteilung der Alloreaktivität einer solchen Konstellation ist die "mixed lymphocyte reaction" (MLR), bei der isolierte Spender- und Empfänger-Zellen *in vitro* über mehrere Tage zusammen inkubiert werden. Durch alloreaktive Zellen sezernierte Zytokine werden anschließend im Überstand gemessen, woraus man auf die Stärke des alloreaktiven Potentials rückschließt. Ebenso kann man hierbei die Proliferation der Lymphozyten, im Sinne einer klonalen Expansion, messen und hieraus die Stärke der Alloreaktion abschätzen. Allerdings macht es dieses Verfahren notwendig, die Spenderzellen vor Inkubationsbeginn zu Bestrahlen oder mit Mitomycin C zu behandeln, da ansonsten die zu messende Reaktion des Empfängers gegen den Spender von einer gleichzeitig ablaufenden Graft-versus-host-Reaktion überlagert werden kann. Ein

weiterer Nachteil liegt in der langen Inkubationsdauer, die nicht den Anforderungen an eine Routinediagnostik gerecht wird. Darüber hinaus kann diese lange Inkubationsdauer durch Sekundäreffekte der sezernierten Zytokine, wie unspezifische Bystander Aktivierung oder Apoptose, zur Verfälschung des Ergebnisses führen. Auch andere experimentelle Ansätze zur Messung direkter Alloreaktivität kamen in letzter Zeit zum Einsatz, hierunter Limiting-Dilution-Assays, Lyse allogener Zielzellen und Zytokinmessungen im Kulturüberstand, doch bisher hat keines dieser Testverfahren Einzug in die klinische Routinediagnostik gehalten, da unverhältnismäßig lange Inkubationszeiten, aufwendige Zellpräparationen oder eingeschränkte Spezifität durch Bystander-Aktivierung dem Einsatz hier entgegenstanden. Man tendiert zur Zeit zu der Annahme, daß die akute Abstoßung in ihrer Initiierung und ihrem Ausmaß vornehmlich der direkten Alloantigenerkennung zuzuschreiben ist, während indirekte Alloreaktivität eine wichtige Rolle beim chronischen Transplantatversagen zu spielen scheint (HEEGER, 2003). Gerade der Einschätzung der präformierten, direkten T-Zell-Alloreaktivität käme damit entscheidende Bedeutung bei der Identifizierung von Patienten zu, die ein erhöhtes Risiko für eine akute Abstoßung nach Transplantation aufweisen, so daß im idealen Falle bereits vor der Transplantation das immunsuppressive Regime der individuellen Situation des Patienten angepaßt werden könnte.

2.7 Ziele der Arbeit

Auf Grund der oben erläuterten Risiken und Nebenwirkungen von Immunsuppressiva, muß es bei der Verabreichung dieser Substanzen in der Transplantationmedizin das Ziel sein, bei jedem Patienten die niedrigst mögliche Immunsuppression zu realisieren, die gerade eben für einen abstoßungsfreien Verlauf notwendig ist. Bisher fehlt es jedoch an einem etablierten Testverfahren zur Messung der Wirkstärke von Immunsuppressiva, das auch in klinischem Rahmen sinnvoll eingesetzt werden kann. Für die Calcineurin-Inhibitoren Cyclosporin A und FK506 wäre es somit wünschenswert, anstelle eines Vollblutspiegels der Substanz, beziehungsweise ergänzend dazu, deren tatsächlichen Effekt auf die T-zelluläre Funktion messen zu können. Hieraus ergäbe sich ein deutlicher Informationsgewinn mit klinischer Relevanz bei der Einschätzung der immunologischen Gesamtsituation transplantierte Patienten, welcher bei der Vermeidung von Über- und Unterimmunsuppression helfen könnte. So beschäftigt sich der erste Teil dieser Arbeit mit der methodischen Etablierung eines durchflußzytometrischen Vollblutassays zur direkten Quantifizierung der Wirkung von Cyclosporin A und FK506 auf die T-zelluläre Immunantwort des Menschen.

Im Rahmen der Organtransplantation wäre es zudem von Interesse, das alloreaktive Potential einer gegebenen Spender-Empfänger-Konstellation möglichst bereits vor der Transplantation einschätzen zu können. Ein solches Meßinstrument wäre von enormer Bedeutung für die Individualisierung des immunsuppressiven Regimes und die Therapieüberwachung. Auch ein solches Testverfahren muß den Anforderungen an ein Routinediagnostikum gerecht werden,

um für prospektive Studien und gegebenenfalls für den klinischen Einsatz sinnvoll zur Verfügung zu stehen. Der zweite Teil dieser Arbeit beschäftigt sich mit der Etablierung und Charakterisierung eines durchflußzytometrischen Kurzzeit-Assays zur Identifikation und Quantifizierung präformierter alloreaktiver T-Zellen.

3 Material und Methoden

3.1 Verwendete Abkürzungen

Abkürzung	Langtext
α	anti
Ag	Antigen
ALG	Anti-Lymphozyten-Globulin
AP1	activating protein 1 (aktivierendes Protein 1)
APC	antigen presenting cell (antigenpräsentierende Zelle)
ATG	Anti-Thymozyten-Globulin
AZA	Azathioprin
BFA	Brefeldin A
BSA	Bovines Serumalbumin
CD	cluster of differentiation
CDR	complementarity-determining region
CMV	cytomegalovirus (Zytomegalie-Virus)
CsA	Cyclosporin A
CTLA-4	cytotoxic-T-lymphocyte-associated antigen 4
DG	Detektionsgrenze
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
EBV	Epstein-Barr-Virus
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
ELISPOT	enzyme-linked immunosorbent spot
FACS	fluorescence activated cell sorting
Fc	fragment crystalline
FCS	fetal calf serum (fetales Kälberserum)
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat

Abkürzung	Langtext
FKBP	FK-bindendes Protein
FSC	forward scatter
HLA	humanes Leukozyten-Antigen
HV4-Schleife	hypervariable Schleife 4
IC ₅₀	inhibitory concentration 50 (inhibitorische Konzentration 50)
IFN γ	Interferon-Gamma
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
iNOS	Inducible nitric oxide synthase (induzierbare Stickoxid-Synthase)
IS	Immunsuppressivum bzw. Immunsuppressiva
I κ -B α	Inhibitor of kappa light chain gene enhancer in B-cells alpha
J.	Jahre
KBR	Komplement-Bindungs-Reaktion
Ko-Ag	Kontroll-Antigen
MFI	mittlere Fluoreszenzintensität
MHC	major histocompatibility complex (Haupt-Histokompatibilitäts-Komplex)
minor-H-Ag	Minor-Histokompatibilitäts-Antigen(e)
MLR	mixed lymphocyte reaction (gemischte Lymphozyten-Reaktion)
MMF	Mycophenolat Mofetil
mRNA	messenger ribonucleic acid (Messenger-Ribonukleinsäure)
mTOR	mammalian target of rapamycin
NFAT	nuclear factor of activated T cells (nukleärer Faktor aktivierter T-Zellen)
NF- κ B	nuclear factor kappa B (nukleärer Faktor Kappa B)
NK-Zellen	natürliche Killerzellen
Pat.	Patient/Patienten
PBMC	peripheral blood mononuclear cells (periphere Blut-mononukleäre Zellen)
PBS	phosphate buffered saline (Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung)
PCR	polymerase chain reaction (Polymerase-Kettenreaktion)

Abkürzung	Langtext
PE	Phycoerythrin
PECy5	Phycoerythrin-Cyanin-5
PerCP	Peridinin-Chlorophyll-Protein
PFA	Paraformaldehyd
SEB	Staphylokokken-Enterotoxin B
SSC	side scatter
Tacrolimus	<u>T</u> sukuba <u>mac</u> rolide <u>im</u> muno <u>s</u> uppressive
TCR	T cell receptor (T-Zell-Rezeptor)
TGF- β	transforming growth factor beta
TNF- α	tumor necrosis factor alpha (Tumornekrosefaktor Alpha)
Upm	Umdrehungen pro Minute
vs.	versus

3.2 Geräte und Verbrauchsmaterialien

Gerätebeschreibung	Hersteller
1,5 ml Reaktionsgefäße	Greiner, Frickenhausen
Autoklav "Systec 2540 EL"	Systec GmbH Labor-Systemtechnik, Wettenberg
Bottletop dispenser (Seridos)	Selzer Labortechnik GmbH, Waghäusel
Brutschrank "CO ₂ -Auto-Zero"	Heraeus, Hamburg
Bunsenbrenner "Fireboy Eco"	Integra Biosciences
Cryo Tubes (1,8 ml) "NUNC CryoTube"	Nalge Nunc International, Dänemark
Einweg-Stabpipetten "Costar Stripette" (1 ml, 2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml)	Corning Incorporated, Corning, New York 14831, USA
Elektrische Pipettiergeräte (Pipetboy acu und Pipetboy plus)	Integra Biosciences, Fernwald
FACScan Durchflußzytometer	BD Biosciences, Heidelberg
FACS-Röhrchen (5 ml Polypropylen- und Polystyrol-Rundbodenröhrchen)	BD Biosciences, Heidelberg
Faltenfilter (Ø15 cm)	Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren

Gerätebeschreibung	Hersteller
Geschliffene Deckgläser	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Kolbenhubpipetten (Gilson "Pipetman P") (10 µl; 20 µl; 100 µl; 200 µl; 1000 µl)	Gilson, Middleton, WI, USA
Leukozytenfilter PALL RCXL2	PALL Medical, England
Mikroskop Nikon TMS	Nikon, Düsseldorf
Milli-Q UF Plus	Millipore, Schwalbach
Neubauer Zählkammern	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Pipettentips (10 µl; 20 µl; 100 µl; 200 µl; 1000 µl)	Greiner, Frickenhausen
Sterile Werkbank Clean Air Type DLF BSS4	Clean Air Techniek bv, Woerden, NL
Sterile Werkbank Tecnoflow	Integra Biosciences, Fernwald
Stickstoff-Lagerbehälter "25LD"	Taylor-Wharton Harsco GmbH, Mildstedt
Stickstoff-Lagerbehälter "GT 80"	Air Liquide GmbH, Berlin
Ultrazentrifuge "Centrifuge 5415 C"	Eppendorf, Hamburg
Vacusaft Absauggerät	Integra Biosciences, Fernwald
Vortex Mixer "neoLab 7-2020"	neoLab Migge Laborbedarf, Heidelberg
Zentrifuge "Hettich Rotanta / RPC"	Andreas Hettich GmbH & Co. KG, Tuttligen
Zentrifuge "Labofuge"	Heraeus, Hanau
Zentrifuge "Megafuge 1.0R"	Heraeus, Hanau
Zentrifugenröhrchen (15 ml, 50 ml)	Greiner, Frickenhausen

3.3 Antikörper, Stimulanzien und Kostimulanzen

In Tabelle 1 sind die fluorochromgekoppelten monoklonalen Antikörper aufgeführt, die zur Zellfärbung benutzt wurden. Neben dem Hersteller der jeweiligen Antikörper, dem assoziierten Fluorochrom und dem Antikörper-Klon ist auch die Konzentration angegeben, in der die jeweiligen Antikörper in dieser Arbeit zum Einsatz kamen (s. entsprechende Kapitel). Tabelle 2 enthält die Stimulanzien und Kostimulanzen, die in dieser Arbeit verwendet wurden (s. entsprechende Kapitel), darüber hinaus die jeweils zur Stimulation eingesetzten Konzentrationen, die Hersteller der Reagenzien und im Falle von Antikörpern den Antikörper-Klon.

Tabelle 1. Fluorochromgekoppelte monoklonale Antikörper zur Zellfärbung.

Antikörper & Fluorochrom	Klon	Konzentration	Hersteller
αCD4-PE	RPA-T4	4 µl / 150 µl Vollblut	BD Biosciences
αCD4-PECy5	13B8.2	5 µl / 1 Mio. PBMC	Coulter Immunotech
αCD4-FITC	13B8.2	4 µl / 150 µl Vollblut	Coulter Immunotech
αCD8-PECy5	DK25	5 µl / 1 Mio. PBMC	DAKO Cytomation
αCD8-PerCP	SK1	4 µl / 150 µl Vollblut	BD Biosciences
αCD45-FITC	BRA-55	4 µl / 1 Mio. PBMC	Sigma-Aldrich
αCD69-PE	L78	2 µl / 150 µl Vollblut	BD Biosciences
αIFNγ-FITC	4S.B3	0,5 µl / 150 µl Vollblut	BD Biosciences
αIFNγ-PE	4S.B3	0,3 µl / 1 Mio. PBMC	BD Biosciences
αIL-2-FITC	MQ1-17H12	0,5 µl / 150 µl Vollblut	BD Biosciences
αIL-4-PE	8D4-8	1 µl / 150 µl Vollblut 0,5 µl / 1 Mio. PBMC	BD Biosciences
αIL-10-PE	JES3-9D7	1 µl / 150 µl Vollblut 0,7 µl / 1 Mio. PBMC	BD Biosciences

Tabelle 2. Stimulanzen und Kostimulanzen.

Reagens	Klon	Konzentration	Hersteller
αCD28	L293	1 µg/ml	BD Biosciences, Heidelberg
αCD49d	9F10	1 µg/ml	BD Biosciences, Heidelberg
CMV-Ag (KBR-Agens)	-	32 µl/ml	Bio Whittaker, Verviers
CMV-Kontroll-Ag	-	32 µl/ml	Bio Whittaker, Verviers, Belgien
SEB	-	2,5 µg/ml	Sigma, Deisenhofen

3.4 Zusammensetzung von Zellkulturmedium und FACS-Puffer

FACS-Puffer	PBS-5%FCS-2,5%BSA-0,1%NaN ₃ (es wurde hierzu durch den Leukozytenfilter "PALL RCXL2" gefiltertes FCS verwandt)
Zellkulturmedium	RPMI 1640 + 10% fetal calf serum + 100 IE/ml Penicillin + 100 µg/ml Streptomycin + 290 µg/ml L-Glutamin

3.5 Übrige Reagenzien / Substanzen

Substanz	Hersteller
Aqua ad iniectionabilia	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
BFA (Brefeldin A)	Sigma, Deisenhofen
BSA (Bovines Serumalbumin)	Serva, Heidelberg
EDTA	Sigma, Deisenhofen
Essigsäure (CH ₃ -COOH)	Sigma, Deisenhofen
FACS Flow	BD Biosciences, Heidelberg
FACS Lysing Solution	BD Biosciences, Heidelberg
FACS Rinse	BD Biosciences, Heidelberg
FCS (fetal calf serum)	BioWhittaker/CAMBREX, Verviers, Belgien
FicoLite-H Separation Medium (Human)	Linaris, Wertheim-Bettingen
L-Glutamin	PAA, Cölbe
Natriumazid (NaN ₃)	Fluka, Buchs, Schweiz
Natrium-Heparin	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
PBS (phosphate buffered saline)	Linaris, Bettingen
Penicillin	PAA, Cölbe
PFA (Paraformaldehyd)	Aldrich-Chemie, Steinheim
RPMI 1640 Zellkulturmedium	Biochrom AG, Berlin
Saponin	Sigma, Deisenhofen
Streptomycin	PAA, Cölbe
Trypanblau	Sigma, Deisenhofen

3.6 Isolierung, Lagerung und Zählung von Zellen

3.6.1 PBMC-Isolierung mittels Dichtezentrifugation

Die Isolierung von peripheren Blut-mononukleären Zellen (PBMC, peripheral blood mononuclear cells) aus Vollblut oder aus buffy coats erfolgte mittels Dichtezentrifugation über einen Ficollgradienten. Dazu wurden in einem 50 ml Röhrchen ca. 10 ml heparinisiertes Vollblut bzw. buffy coat mit PBS-0,02%EDTA auf 35 ml aufgefüllt. Nach leichtem Mischen wurde vorsichtig mit 13 ml Ficoll unterschichtet. Anschließend folgte eine zwanzigminütige

Zentrifugation bei 2500 Upm in einer auf 4°C gekühlten Zentrifuge, wobei die Bremse der Zentrifuge ausgeschaltet wurde, um den Gradienten und den sich ergebenden PBMC-Saum nicht durch das abrupte Abbremsen zu zerstören. Das Prinzip dieser Methode besteht darin, daß Monozyten und Lymphozyten eine geringere Dichte als das unterschichtete Ficollmedium, jedoch eine höhere Dichte als die Plasma-PBS-Mischung haben, so daß sie sich während der Zentrifugation an der Grenzschicht zwischen Plasma-PBS-Mischung und Ficoll sammeln und diese nicht überschreiten, während die anderen festen Blutbestandteile eine höhere Dichte als das Ficollmedium besitzen und sich auf Grund dessen bis auf den Boden des Röhrchens herunterzentrifugieren lassen. Nach diesem ersten Zentrifugationsschritt befindet sich auf der Grenze zwischen Plasma-PBS-Mischung und Ficoll ein weißlicher Saum, der aus PBMC besteht. Dieser wurde mit einer 5 ml Stabpipette abgezogen und in ein neues 50 ml Röhrchen überführt. Hierbei ist darauf zu achten, daß man sich während des Abziehens mit der Pipette möglichst nur innerhalb des Saumes bewegt und nicht allzuviel des darunter befindlichen Ficollmediums aufnimmt. Die PBMC wurden nun mit PBS-0,02%EDTA auf 50 ml aufgefüllt und erneut für 10 Minuten bei 1800 Upm und 4°C zentrifugiert. Bei dieser und der folgenden Zentrifugation wurde mit eingeschalteter Bremse gearbeitet. Nach Absaugen des Überstandes folgte ein weiterer Waschschrift: Das Zellpellet wurde in 30 ml PBS-0,02%EDTA resuspendiert und erneut für 10 Minuten bei 1200 Upm und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Pellet in Zellkulturmedium resuspendiert. Die gesamte Prozedur wurde unter sterilen Bedingungen durchgeführt und desweiteren auf Kühlung der Zellen geachtet: Wenn die Zellen sich nicht in der gekühlten Zentrifuge befanden, wurden sie wann immer möglich auf Eis gelagert. Wir verwandten im Rahmen dieser Arbeit ausschließlich hitzeinaktiviertes FCS. Hierzu wurde das FCS zwecks Inaktivierung des darin befindlichen Komplements in einem Wasserbad für 30 Minuten auf 56°C erwärmt.

3.6.2 Einfrieren von PBMC in flüssigem Stickstoff und Auftauen von gefrorenen PBMC

Zum Einfrieren von frisch isolierten PBMC wurden diese in Zellkulturmedium aufgenommen. Das Volumen wurde hierbei so gewählt, daß pro 0,9 ml Medium die Zahl PBMC enthalten war, die pro Kryo-Röhrchen eingefroren werden sollte. Separat dazu wurde ein Einfriermedium bestehend aus 60% FCS für Zellkultur, 20% DMSO und 20% Zellkulturmedium gerichtet. Eine Mischung dieser beiden Medien im Verhältnis 1:1 stellt somit folgende Endkonzentration ein:

- 30% FCS
- 10% DMSO
- 60% Zellkulturmedium

Ausreichend viele Kryoröhrchen wurden beschriftet und in jedes 0,9 ml des Mediums mit den Zellen vorgelegt. Nun wurden zu jedem Röhrchen 0,9 ml Einfriermedium hinzupipettiert, die Röhrchen verschlossen, in passende Styroporständer eingeschlossen, durch mehrmaliges Drehen leicht gemischt und bei -70°C gelagert. Die Styroporhülle dient dazu, ein langsames, schonendes Einfrieren der Zellen sicherstellen. Nach einigen Tagen wurden die Röhrchen in flüssigen Stickstoff überführt. Bei der gesamten Prozedur wurde zügig gearbeitet. Insbesondere wurden die Zellen, sobald das DMSO hinzugegeben war, schnellstmöglich in den Gefrierschrank verbracht, da DMSO eine zellschädigende Wirkung besitzt. Desweiteren wurde, wann immer möglich, auf gute Kühlung der Zellen geachtet. Die Arbeit mit den Zellen wurde unter sterilen Bedingungen durchgeführt.

Zum Auftauen von in flüssigem Stickstoff gelagerten PBMC wurden je 10 ml 37°C warmes RPMI 1640 in vorher beschriftete 15 ml Röhrchen gegeben. Die aufzutauenden Kryoröhrchen wurden aus dem Stickstofftank genommen und in einem 37°C warmen Wasserbad leicht angetaut. Nach äußerer Desinfektion der Röhrchen mit Ethanol wurden die Zellen mit 5 ml Stabpipetten in die entsprechenden 15 ml Greiner-Röhrchen überführt. Hierbei wurde mit der Stabpipette eine kleine Menge des warmen Mediums aufgenommen und damit durch Auf- und Abpipettieren im Kryoröhrchen die Zellen resuspendiert, die dann leicht in das Röhrchen zu überführen sind. Nach dem Verschließen der Röhrchen wurden diese durch Kippbewegungen leicht gemischt und bei 1100 Upm für 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Pellet in einem angemessenen Volumen Zellkulturmedium resuspendiert. Sämtliche Arbeiten an den Zellen wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Desweiteren wurden die Zellen, wann immer möglich, auf Eis gelagert.

3.6.3 Zellzählung

Zellzählung mit Trypanblau:

Zur Zellzählung aufgetauter PBMC wurden diese mit Trypanblau (0,4% in Aqua bidest.) gefärbt. Hierdurch ist eine Vitalitätsprüfung der Zellen möglich, da Trypanblau lebendige, intakte Zellen nicht anfärbt. Dadurch kann zum einen die Güte der Einfrier-, Aufbewahrungs- und Auftauprozedur beurteilt werden, und zum anderen wird sichergestellt, daß man für die nachfolgenden Experimente bei den Einstellungen der Zellkonzentrationen von den vitalen Zellen ausgeht. Für die Färbung wurden die Zellen mit Trypanblau im Verhältnis 1:10 oder 1:20 verdünnt und leicht gemischt. Der Verdünnungsfaktor ist variabel und dem Einzelfall anzupassen. Er richtet sich sowohl nach der Zahl aufgetauter Zellen, als auch nach dem Volumen, in dem diese aufgenommen sind. Bei hoher zu erwartender Zellkonzentration wählt man einen entsprechend höheren Verdünnungsfaktor. Zu starke Verdünnung führt allerdings zu ungenauen Ergebnissen bei der Zellzählung. Nach einer Einwirkzeit des Trypanblau von 3 Minuten wurden die Zellen innerhalb der folgenden 5 Minuten ausgezählt. Dies ist wichtig, da

bei fortschreitender Einwirkung des Trypanblau zunehmend auch lebendige Zellen angefärbt werden. Ausgezählt wurden in einer Neubauerzählkammer mindestens zwei sich diagonal gegenüberliegende Eckquadrate bestehend aus jeweils 16 Kleinquadraten. Nach Berechnung der Zahl n der Zellen pro 16 Kleinquadrate ergibt sich die Konzentration der Zellen in der Zählösung dann zu:

$$\text{Zellkonzentration}_{\text{Zählösung}} = n \cdot 10^4 \text{ Zellen pro ml}$$

Berücksichtigt man den Verdünnungsfaktor, ergibt sich für eine x -fache Verdünnung:

$$\text{Zellkonzentration}_{\text{Medium}} = n \cdot x \cdot 10^4 \text{ Zellen pro ml}$$

Zellzählung mit Essigsäure:

Die Zellzählung mit Essigsäure wurde der Zählung mittels Trypanblaufärbung vorgezogen, wenn es sich bei den zu zählenden Zellen um frisch isolierte PBMC handelte und neben den PBMC eine erhöhte Anzahl von Erythrozyten im Medium zu erwarten war. Durch die Behandlung mit Essigsäure kommt es zu einer Lyse der Erythrozyten. Diese können ansonsten leicht mit Lymphozyten verwechselt und irrtümlich mitgezählt werden. Eine Unterscheidung in vitale und nicht vitale Zellen ist bei der Zählung mit Essigsäure nicht möglich, jedoch ist bei frisch isolierten PBMC nicht mit einem relevanten Anteil avitaler Zellen zu rechnen. Bei aufgetauten PBMC hingegen ist eine Einschätzung dieses Anteils angebracht, während hier eine Erythrozytenlyse nicht notwendig ist, da Erythrozyten durch den Prozeß des Einfrierens und Auftauens ohnehin zerstört werden. Für die Zählung wurde 3%ige Essigsäure verwendet. Die Einwirkzeit auf die Zellen in der Zählprobe betrug ca. 3-5 Minuten. Die Verdünnung der Zählprobe richtete sich, analog der für die Trypanblau-Zählung beschriebenen Prozedur, nach der in der Probe erwarteten Zellkonzentration. Die eigentliche Zählprozedur und die Formeln zur Berechnung der Zellkonzentration sind ebenfalls dem Abschnitt über die Zellzählung mit Trypanblau zu entnehmen.

3.7 Stimulationsmethoden und Fixierung

3.7.1 Vollblutstimulation

Die T-Zell-Stimulation aus Vollblut erfolgte in 15 ml Röhrchen. Diese Röhrchen werden im folgenden als Stimulationsansatz bezeichnet, die daraus nach der Fixierung entnommenen und gefärbten Zellen als Probe. Pro Probe wurden 150 µl Lithium-heparinisiertes Vollblut eingesetzt, wobei ein Gesamtvolumen pro Stimulationsansatz von 600 µl Vollblut (entsprechend 4 Proben) nicht überschritten wurde. Das benötigte Blutvolumen pro Patient / Proband wurde mit kostimulatorischen Antikörpern (αCD28 und αCD49d, Konzentration s. Tabelle 2 unter 3.3) versetzt und auf die 15 ml Röhrchen verteilt. Zu jedem Simulationsansatz

wurden anschließend die Antigene entsprechend der Dosierung in Tabelle 2 hinzupipettiert. Nach kurzem Mischen wurden die Ansätze für 2 Stunden aufrecht bei 37°C und 6% CO₂ im Brutschrank inkubiert, wobei die Deckel der Röhrchen nur locker aufgesetzt wurden, um einen ungehinderten Gasaustausch zu ermöglichen. In diesen zwei Stunden konnte in den Ansätzen eine ungestörte Antigenprozessierung und -präsentation stattfinden. Anschließend wurde zu jedem Ansatz 10 µg/ml Brefeldin A hinzupipettiert, um von diesem Zeitpunkt an eine Sekretion der induzierten Zytokine zu unterbinden und diese somit im Zellinneren einzuschließen. Wir verwendeten eine BFA Stocklösung von 5 mg/ml BFA in Ethanol. Die Ansätze wurden weitere 4 Stunden unter den oben beschriebenen Bedingungen im Brutschrank inkubiert und anschließend fixiert. Die beschriebene Methode stellt das Schema einer Standardstimulation dar. Stimulationsdauer sowie Zeitpunkt der BFA-Zugabe können je nach Fragestellung variieren. Soweit nicht anders angegeben, wurde dieses Protokoll eingesetzt. Abweichungen hiervon sind an betreffender Stelle aufgeführt.

3.7.2 Fixierung von Vollblutansätzen

Eine Fixierung der Ansätze war aus folgendem Grunde nötig: Ein wichtiges Ziel der meisten unserer Experimente war die qualitative und quantitative Bestimmung der in den Lymphozyten induzierten Zytokine mittels Durchflußzytometrie. Dies setzt zum einen voraus, daß die Zytokine nicht in den Überstand sezerniert, sondern im Inneren der Zellen akkumuliert werden, realisiert durch die Zugabe von Brefeldin A während des Stimulationsprozesses. Zum anderen müssen die intrazellulären Zytokine, um sie der gewünschten Analyse zugänglich zu machen, mit fluorochromgekoppelten Antikörpern markiert werden. Damit diese Antikörper nach intrazellulär gelangen können, muß die Zellmembran der Lymphozyten permeabilisiert werden, wobei jedoch die Zytokine nicht aus der Zelle austreten dürfen. Die Fixierung dient also dazu, die intrazellulären Strukturen und Proteine durch leichte Denaturierung miteinander zu vernetzen, so daß diese die Zellen bei der anschließenden Permeabilisierung nicht verlassen können. Für Vollblutansätze wurde folgendes Protokoll verwendet: Zunächst wurden zu jedem Ansatz 2 mM EDTA aus einer 20 mM EDTA (pH 8,0) in Aqua bidest. Stocklösung gegeben, um Zell-Zell-Adhärenzen und Adhärenzen der Zellen mit der Wand des Röhrchens zu lösen. Nach dieser EDTA-Zugabe wurde jeder Ansatz für 10 Sekunden gevortext und 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden zu jedem Ansatz 9 ml/ml Ansatzvolumen Becton Dickinson Lysing Solution gegeben. Diese dient der Fixierung und lysiert im selben Schritt die im Ansatz befindlichen Erythrozyten. Nach zehnminütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Ansätze für weitere 10 Minuten bei 1300 Upm zentrifugiert und anschließend der Überstand abgesaugt. Das Pellet wurde in jeweils 2 ml PBS-5%FCS-2,5%BSA-0,1%NaN₃ (FACS-Puffer) resuspendiert und erneut 10 Minuten bei 1300 Upm zentrifugiert. Nach Absaugen des Überstandes wurde das Zellpellet in 200 µl FACS-Puffer pro Probe, d.h. pro eingesetzten 150 µl Vollblut, aufgenommen.

3.7.3 Stimulation von PBMC

Analog der Stimulation von Vollblutansätzen (beschrieben unter 3.7.1) wurden auch bei der PBMC-Stimulation kostimulatorische Antikörper in gleicher Konzentration eingesetzt. Die Stimulation wurde in 5 ml Polypropylen-Rundbodenröhrchen durchgeführt, wobei ein Standardansatz 2 Mio. PBMC in 450 µl Zellkulturmedium enthielt. Alle nachfolgenden Stimulationsschritte sind identisch mit dem unter 3.7.1 beschriebenen Vorgehen.

3.7.4 Fixierung von PBMC

Zum Inkubationsende wurden zunächst zu jedem Ansatz 2 mM EDTA aus einer 20 mM EDTA (pH 8,0) in Aqua bidest. Stocklösung hinzupipettiert und jeder Ansatz für 10 Sekunden gevortext, um Adhärenzen der Zellen mit dem Polypropylen-Röhrchen und Zell-Zell-Adhärenzen zu lösen. Nach einer fünfzehnminütigen Inkubation bei Raumtemperatur wurden jedem Ansatz 2 ml PBS-0,02%EDTA (unabhängig vom Ansatzvolumen) zugegeben und die Ansätze 10 Minuten bei 1100 Upm und Raumtemperatur zentrifugiert. Nach Absaugen des Überstandes wurden die Zellpellets in jeweils 300 µl warmem (37°C) PBS-4%PFA resuspendiert. Nach einer Inkubation von exakt 5 Minuten pro Ansatz bei Raumtemperatur wurden zu jedem Ansatz, unabhängig vom ursprünglichen Ansatzvolumen, 1200 µl kalter (4-8°C) FACS-Puffer zugegeben und die Ansätze erneut 10 Minuten bei 1100 Upm und Raumtemperatur zentrifugiert. Nach Absaugen des Überstandes wurden die Zellpellets in jeweils 200 µl FACS-Puffer pro später zu färbender Probe resuspendiert. Waren unter den zu fixierenden Ansätzen auch solche, die mit fluorochromgekoppelten Antikörpern vorgefärbte PBMC enthielten, so wurden die Ansätze, wann immer möglich, während des Fixierungsprozesses lichtgeschützt aufbewahrt.

3.7.5 Immunsuppressiva-Spiegeleinstellung *in vitro*

Die verwendeten Immunsuppressiva (Cyclosporin A und FK506) wurden in verschiedenen Konzentrationen in reinem Ethanol gelöst und den Vollblutansätzen zwei Stunden vor Stimulationsbeginn zugegeben. Dabei waren die Immunsuppressiva vorher so in Ethanol aufgenommen worden, daß jeweils eine Verdünnung um den Faktor 500 die angestrebte Konzentration im Ansatz einstellte. Dadurch war der Ethanolgehalt für ein festgelegtes Ansatzvolumen einerseits sehr niedrig und darüber hinaus über alle eingesetzten Immunsuppressiva-Konzentrationen identisch. Nach Zugabe der Immunsuppressiva verblieben die unstimulierten Ansätze bis zum eigentlichen Stimulationsbeginn bei 4-8°C im Kühlschrank.

3.7.6 Allospezifische Stimulation mit PBMC *in vitro*

Nach obenstehenden Protokollen wurden frisch isolierte (3.6.1) oder aufgetaute (3.6.2) PBMC der zu testenden Probanden gezählt (3.6.3). Grundsätzlich wurden von jedem der beiden an der Alloreaktion beteiligten Probanden 1 Mio. PBMC im endgültigen Ansatz eingesetzt. In manchen Experimenten wurden die Zellen eines der beiden Probanden mit einem FITC-konjugierten monoklonalen Antikörper gegen den Panleukozytenmarker CD45 vorgefärbt, um die Zellen der beiden Probanden bei der späteren durchflußzytometrischen Analyse voneinander differenzieren zu können. Hierzu wurden die vorzufärbenden Zellen jedes Probanden jeweils in ein neues 15 ml Röhrchen überführt. Diese Röhrchen wurden mit sterilem PBS auf 14 ml aufgefüllt und bei 1100 Upm zentrifugiert. Nach sterilem Absaugen des Überstandes wurden die Pellets in dem zuvor hergestellten Färbeansatz resuspendiert, wobei 50 µl Färbeansatz (zusammengesetzt aus 4 µl αCD45-FITC und 46 µl sterilem PBS) pro 1 Mio. PBMC eingesetzt wurde. Das Antikörpermisch wurde grundsätzlich erst unmittelbar vor der Färbung hergestellt und bis zur Verwendung lichtgeschützt aufbewahrt. Dann wurden die Röhrchen für 30 Minuten bei 4-8°C inkubiert, anschließend erneut mit sterilem PBS auf 14 ml aufgefüllt und 10 Minuten bei 1100 Upm zentrifugiert. Nach gründlichem sterilen Absaugen des Überstandes, um ungebundene Antikörper möglichst vollständig zu entfernen, wurden die Zellen mit Zellkulturmedium auf eine Zellkonzentration von 1 Mio. PBMC pro 225 µl Medium eingestellt. Auch die nicht vorgefärbten Zellen wurden mittels Zugabe von Zellkulturmedium auf eine Konzentration von 1 Mio. PBMC pro 225 µl Medium gebracht. Nun wurden zu jedem Ansatz die kostimulatorischen Antikörper αCD28 und αCD49d in der Konzentration von jeweils 1 µg/ml hinzupipettiert. Die eigentlichen Stimulationsansätze wurden nun hergestellt, indem von den beiden an der Reaktion beteiligten Probanden jeweils 225 µl des entsprechenden Ansatzes in einem 5 ml Polypropylen-Rundbodenröhrchen zusammengeführt wurden. Unmittelbar nach Mischen der Spender- und Empfängerzellen in den Polypropylen-Rundbodenröhrchen wurden diese für 5 Minuten bei 1100 Upm und Raumtemperatur zentrifugiert und anschließend bei 37°C und 6% CO₂ für 30 Minuten inkubiert. Danach wurden die Zellen vorsichtig resuspendiert und erneut für 5 Minuten bei 1100 Upm und Raumtemperatur zentrifugiert. Dann folgte eine erneute Inkubation bei 37°C und 6% CO₂ für 1,5 Stunden. Nach dieser Inkubation wurde zu den Ansätzen 10 µg/ml Brefeldin A hinzupipettiert, die Ansätze gevortext und nochmals für 5 Minuten bei 1100 Upm und Raumtemperatur zentrifugiert. Daran schloß sich eine vierstündige Inkubation bei 37°C und 6% CO₂ an. Nach dieser Inkubation wurden die Ansätze entsprechend dem Protokoll unter 3.7.4 fixiert.

3.8 Färbetechniken

3.8.1 Permeabilisierung und intrazelluläre Zytokinfärbung

Wie zu Beginn des Abschnittes 3.7.2 erläutert, muß die Zytoplasmamembran der Lymphozyten vor der Anfärbung der intrazellulär akkumulierten Zytokine permeabilisiert werden, um den fluorochromgekoppelten Antikörpern den Eintritt in die Zelle zu ermöglichen. Für die Permeabilisierung und Färbung wurden die fixierten Ansätze zunächst à 200 µl (vergleiche 3.7.2 und 3.7.4) auf Polystyrol- bzw. Polypropylen-Rundbodenröhrchen (je nach verwendetem Durchflußzytometer) verteilt. Zu jeder dieser Proben wurden 2 ml Saponinpuffer (PBS-5%FCS-2,5%BSA-0,1%NaN₃-0,1%Saponin) hinzupipettiert. Nach zehnmütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Proben für 10 Minuten bei 1100 Upm zentrifugiert und anschließend der Überstand abgesaugt. Danach wurde das Pellet jeder Probe in 50 µl des entsprechenden Färbeansatzes (siehe 3.8.2) resuspendiert und 30 bis 45 Minuten lichtgeschützt bei Raumtemperatur inkubiert. Darauf folgte ein Waschschriff mit jeweils 3 ml FACS-Puffer und wiederum eine zehnmütige Zentrifugation bei 1100 Upm und Raumtemperatur. Nach anschließendem Absaugen der Überstände wurden die Pellets in jeweils 100 µl PBS resuspendiert und durchflußzytometrisch analysiert. Proben, die erst am folgenden Morgen zur Analyse anstanden, wurden statt dessen in PBS-1%Paraformaldehyd resuspendiert und über Nacht bei 5-8°C aufbewahrt. Die Aufnahme in PBS-1%PFA wurde nicht auf Proben angewandt, die mit PECy5-gekoppelten Antikörpern nachgefärbt waren, da dies eine Dissoziation des Fluorochroms bewirkt. Diese Proben wurden ausnahmslos in PBS aufgenommen und innerhalb von 8 Stunden analysiert.

3.8.2 Herstellung der Färbeansätze für die Nachfärbung fixierter Zellen

Für die Färbeansätze zur Nachfärbung fixierter Zellen wurde stets ein Volumen von 50 µl je zu färbender Probe vorgesehen. Die fluorochromgekoppelten Antikörper wurden zuvor einmalig austitriert, um die geeignete Konzentration zu bestimmen, die pro Probe einzusetzen ist. Ein Färbeansatz für eine Probe setzte sich zusammen aus den gewünschten fluorochromgekoppelten Antikörpern (in den in Tabelle 1 angegebenen Dosierungen, s. 3.3) zuzüglich 1 µl Saponin-5%. Die Volumendifferenz zum Gesamtvolumen von 50 µl wurde mit FACS-Puffer ausgeglichen.

Nach Abschluß der Testphase kamen in den endgültigen Experimenten folgende Färbe-Antikörper zum Einsatz:

Allostimulationen (PBMC):

Antikörper für Vorfärbung: αCD45-FITC

Antikörper für Nachfärbung: αCD4-PECy5, αCD8-PECy5, αIFNγ-PE

Stimulationen mit viralen Antigenen und SEB (Vollblut):

Antikörper für Nachfärbung: α CD4-PE, α CD4-FITC, α CD8-PerCP, α IFN γ -FITC, α IL-2-FITC, α IL-4-PE, α IL-10-PE

3.9 Software

Cellquest (Acquisition von FACS-Daten), WinMDI (Auswertung von FACS-Daten), GraphPad Prism (statistische Auswertung und graphische Darstellung von Daten), Microsoft Access (Antikörperdatenbank, Probandendatenbank inkl. HLA-Datenbank), Microsoft Excel und Lotus 1-2-3 (Tabellenkalkulation), Microsoft Word.

3.10 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte mit der Software Prism v3.03 und v4.01 der Firma Graphpad, San Diego, Kalifornien. Signifikanzen zwischen zwei Gruppen wurden mittels Mann-Whitney-Test ermittelt. Abhängigkeit für zwei oder mehr Variablen wurde mittels Fisher's exaktem Test bzw. Chi-Quadrat-Test ermittelt. Sofern nicht anders bezeichnet, sind Daten als Mittelwert \pm Standardabweichung angegeben.

4 Ergebnisse

TEIL 1

4.1 IFN γ , IL-2, IL-4 und IL-10 werden bereits innerhalb der ersten sechs Stunden nach Stimulationsbeginn exprimiert

Als Parameter zur Beurteilung der Wirkung der Immunsuppressiva Cyclosporin A (CsA) und Tacrolimus (FK506) diente die Zytokinexpression in T-Lymphozyten nach Stimulation. Als Stimulans wurde zum einen CMV-Komplettantigen bei CMV-positiven Probanden eingesetzt als Beispiel für eine physiologische, hochspezifische Stimulation, die vor allem CD4-T-Zellen aktiviert. Darüber hinaus wurden auch Stimulationen mit dem Superantigen Staphylococcus aureus Enterotoxin B (SEB) durchgeführt, welche unabhängig vom CMV-Status des Probanden eingesetzt werden kann und eine deutliche Stimulation von CD4- und CD8-T-Zellen bewirkt. Betrachtet wurden die Th1-Zytokine IFN γ und IL-2 sowie die Th2-Zytokine IL-4 und IL-10. Um die Wirkung von Immunsuppressiva auf die Zytokinexpression korrekt beurteilen zu können, wurde vorab die Kinetik dieser Expression ohne Zugabe von Immunsuppressiva untersucht.

Zeitkinetiken mit BFA-Zugabe jeweils 2 Stunden nach Stimulationsbeginn

Zunächst wurde die Expressionskinetik der genannten Zytokine bei Zugabe von BFA jeweils 2 Stunden nach Stimulationsbeginn betrachtet. Hierdurch wurde eine kumulative intrazelluläre Anreicherung der Zytokine bis zum Ende der jeweiligen Stimulationsdauer erzielt. Untersucht wurden für IFN γ und IL-2 jeweils 2 Probanden nach CMV- und 4 Probanden nach SEB-Stimulation. Für IL-4 und IL-10 wurden je 1 Proband nach CMV- und 3 Probanden nach SEB-Stimulation betrachtet. Die Stimulation erfolgte nach Standardprotokoll mit variabler Stimulationsdauer zwischen 4 und 18 Stunden. Abbildung 1 zeigt dies repräsentativ für das Zytokin IFN γ . Dargestellt sind die Kurvenverläufe für 4 Probanden nach SEB-Stimulation und zwei Probanden nach CMV-Ag-Stimulation. Die Kurven für alle untersuchten Probanden zeigten einen ähnlichen Verlauf, die erreichten Frequenzniveaus waren jedoch interindividuell sehr unterschiedlich. Während IFN γ und IL-2 in unstimulierten Proben weder nach sechsstündiger noch nach achtzehnstündiger Stimulation nennenswert nachweisbar waren (Daten nicht gezeigt), zeigte sich für IL-4 und, mit niedrigerer Frequenz, IL-10 auch in unstimulierten Proben eine Expression im Sinne einer Basisproduktion (Daten nicht gezeigt, siehe auch Abb. 5). Die Maximalfrequenz stellte sich in diesen Experimenten für die betrachteten Zytokine in der Regel zwischen sechs und zwölf Stunden nach Stimulationsbeginn ein. Zu erwähnen ist, daß nach antigenspezifischer Stimulation mittels CMV-Ag keine IL-2-Induktion in zytotoxischen CD8-T-Lymphozyten, wohl aber in CD4-T-

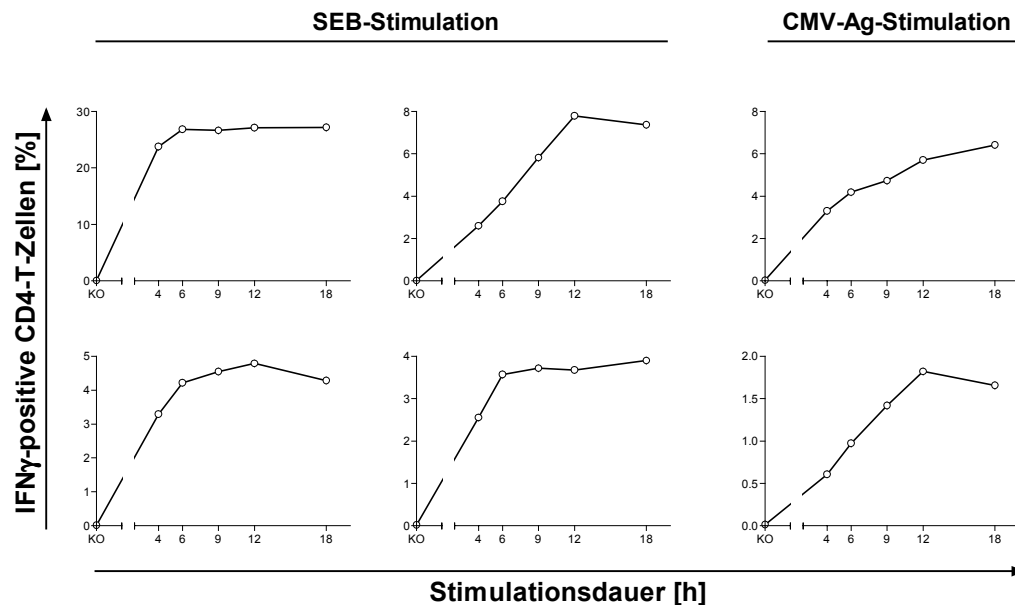


Abbildung 1. Die Kinetik der IFN γ -Expression nach SEB- bzw. CMV-Ag-Stimulation zeigte bei allen untersuchten Probanden einen ähnlichen Verlauf. Das erreichte Frequenzniveau war jedoch individuell sehr unterschiedlich. Hier ist am Beispiel sechs gesunder Kontrollprobanden die kumulative IFN γ -Expression in CD4-T-Zellen dargestellt. Die Maximalfrequenz stellte sich meist nach einer Stimulationsdauer zwischen sechs und zwölf Stunden ein. Der zügigste Anstieg der Zytokinexpression fand sich hierbei in der Regel innerhalb der ersten sechs Stunden.

Helferzellen nachzuweisen war. Nach Stimulation mit dem Superantigen SEB war IL-2 in beiden Zellpopulationen deutlich detektierbar.

Zeitkinetiken mit BFA-Zugabe jeweils 4 Stunden vor Stimulationsende

Hier wurde der gleiche Versuchsaufbau wie für die oben beschriebenen Kinetiken verwendet, jedoch erfolgte die BFA-Zugabe jeweils vier Stunden vor Stimulationsende. Diese Versuchsanordnung erlaubt bis zum Zeitpunkt der BFA-Zugabe eine ungestörte Sekretion aller exprimierten Zytokine in das Medium, wodurch bei längerer Stimulationsdauer vermehrt zytokinvermittelte Sekundäreffekte in das Expressionsmuster der T-Zellen eingehen. In Abbildung 2 sind diese Daten repräsentativ für IFN γ dargestellt. Im Vergleich zu den Ansätzen mit variabler Dauer der BFA-Einwirkung war hier in einigen Ansätzen ein Abfallen der Frequenz zytokinpositiver T-Zellen ab einer Stimulationsdauer zwischen neun und zwölf Stunden zu beobachten. Ansonsten zeigten sich keine wesentlichen Unterschiede. Auch in diesen Ansätzen wurde das Maximum der Induktion aller betrachteten Zytokine zwischen sechs und zwölf Stunden nach Stimulationsbeginn beobachtet. Auf Grund dieser Daten, im Besonderen des raschen Frequenzanstiegs in den initialen sechs Stunden, wurde für die nachfolgenden Experimente zur Quantifizierung der Wirkstärke von Immunsuppressiva eine Stimulationsdauer von sechs und zwanzig Stunden vorgesehen. Dadurch ließ sich sowohl der Einfluß auf die Anstiegsphase der Kinetik als auch auf eine mögliche Beeinflussung durch Sekundäreffekte in einer späteren Phase der T-Zellaktivierung beurteilen.

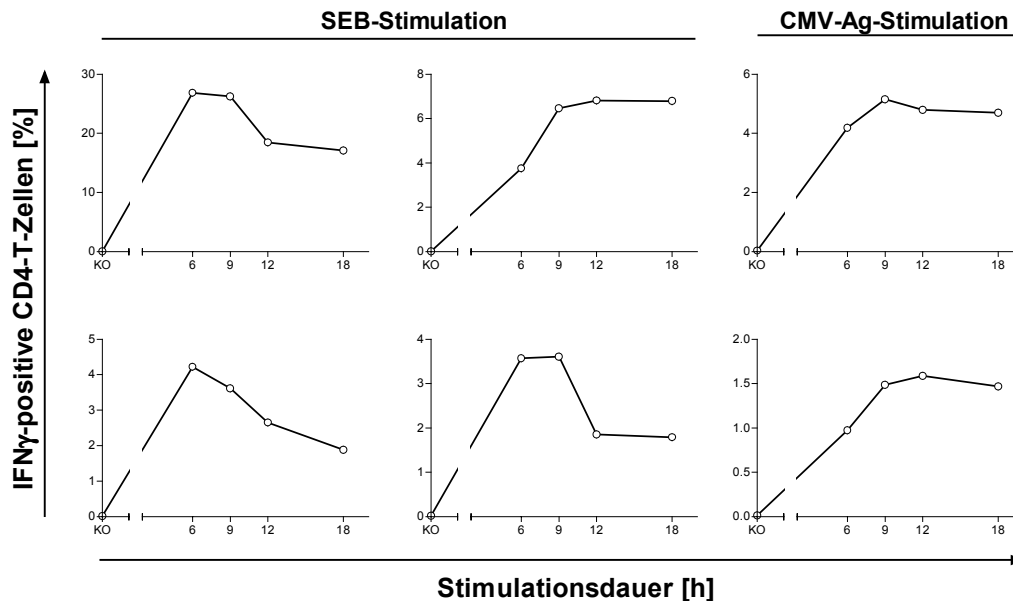


Abbildung 2. Die Rate der IFN γ -Induktion erreichte bei den untersuchten Probanden ihr Maximum bei einer Stimulationsdauer zwischen sechs und zwölf Stunden. Hier ist am Beispiel sechs gesunder Kontrollprobanden die IFN γ -Induktion in CD4-T-Zellen in den letzten vier Stunden vor Stimulationsende nach SEB- bzw. CMV-Ag-Stimulation gezeigt. Die BFA-Zugabe erst vier Stunden vor Stimulationsende erlaubte in diesen Ansätzen eine freie Zytokinsekretion bis zu diesem Zeitpunkt und ließ damit zytokinvermittelte Sekundäreinflüsse auf das Expressionsmuster der untersuchten Zytokine zu. Gegen Ende einer achtzehnstündigen Stimulation zeigte die IFN γ -Induktionsrate bei den meisten Probanden bereits wieder einen Abfall.

4.2 Durch Cyclosporin A bzw. FK506 läßt sich die Induktion von IFN γ und IL-2 dosisabhängig bei klinisch relevanten Konzentrationen hemmen

Im folgenden sollte der Einfluß von CsA und FK506 auf die Induktion der Th1-Zytokine IFN γ und IL2 eingehender untersucht werden. Insbesondere ging es um die Fragestellung, ob der vorliegende Assay es erlaubt, nach *in-vitro*-Einstellung klinisch relevanter Vollblutspiegel eine signifikante Wirkung dieser Immunsuppressiva nachzuweisen. Zum Einsatz kamen die Calcineurin-Inhibitoren hierbei in den in Tabelle 3 angegebenen Konzentrationen [die Bezeichnungen "mittlerer Wirkspiegel" und "supratherapeutischer Spiegel" orientieren sich an der in der Literatur beschriebenen Pharmakokinetik der Calcineurin-Inhibitoren (AUMENTE RUBIO et al., 2003; KNOOP et al., 2003) und dienen lediglich der groben Einordnung]. Mit Hinblick auf die unter 4.1 beschriebenen Zeitkinetiken wurden neben einer sechsständigen Stimulationsdauer mit BFA-Zugabe zwei Stunden nach Stimulationsbeginn zusätzlich zwanzigstündige Stimulationen mit BFA-Zugabe vier Stunden vor Stimulationsende und zwanzigstündige Stimulationen mit BFA-Zugabe zwei Stunden nach Stimulationsbeginn durchgeführt. Die 6h-Ansätze dienten hierbei zur Betrachtung der frühen Phase der T-Zellaktivierung. Die 20h-Stimulationsansätze mit BFA-Zugabe vier Stunden vor Stimulationsende wurden aufgenommen, um eine Aussage über die Zytokininduktion in einer späteren Phase der T-Zell-Aktivierung treffen zu können, in die auch Sekundäreffekte durch

	CsA [ng/ml]	FK506 [ng/ml]
Mittlerer Wirkspiegel	370,3	22,2
Suprathérapeutischer Spiegel	3333	200

Tabelle 3. Konzentrationen der Calcineurin-Inhibitoren für die Spiegeleinstellung *in vitro*.

vorherige sechzehnständige freie Sekretion von Zytokinen in den Überstand eingehen. Im Gegensatz dazu dienten die 20h-Ansätze mit BFA-Wirkung über achtzehn Stunden dazu, eine Einschätzung der kumulativen Zytokininduktion über ein 18h-Intervall zu treffen. Die Stimulation erfolgte einerseits mit CMV-Ag, um eine physiologische, hochspezifische Stimulation zu erreichen. Daneben wurden Stimulationen mit SEB durchgeführt. Als Kontrollansätze (Leerwerte) dienten Ansätze, denen CMV-Kontroll-Ag bzw. kein Stimulans zugegeben war. Untersucht wurden für jede Stimulation drei gesunde Probanden. Die untersuchten Th1-Zytokine IFN γ und IL-2 wurden in den unstimulierten Kontrollansätzen sowohl nach 6 Stunden wie auch nach 20 Stunden nicht exprimiert (Daten nicht gezeigt). Nach Stimulation mit SEB über sechs Stunden (Abb. 3) zeigte sich sowohl in CD4- als auch in CD8-T-Zellen eine starke IFN γ -Induktion. Die IL-2-Induktion fiel in CD4-T-Zellen nach SEB-Stimulation ebenfalls sehr stark aus, in CD8-T-Zellen war sie schwächer, aber immer noch deutlich differenzierbar. Nach Stimulation mit CMV-Ag über sechs Stunden (Abb. 3) wurden IFN γ und IL-2 in CD4-T-Zellen deutlich induziert. In CD8-T-Zellen war die IFN γ -Antwort nach CMV-Ag-Stimulation recht schwach, aber dennoch abgrenzbar. IL-2 hingegen wurde durch CMV-Ag in CD8-T-Zellen nicht induziert. Durch Vorinkubation mit CsA bzw. FK506 wurde in der Frühphase der T-Zell-Aktivierung die Induktion von IFN γ und IL-2 sowohl in CD4- als auch in CD8-T-Zellen deutlich dosisabhängig gehemmt (Abb. 3). Dies war für SEB-stimulierte und, bei vergleichsweise niedrigerem Frequenzniveau, auch für CMV-Ag-stimulierte Proben zu beobachten. Für CD4-T-Zellen bewirkte in der frühen Phase der T-Zell-Aktivierung nach SEB-Stimulation ein Cyclosporinspiegel von 370,3 ng/ml eine Inhibition der IFN γ -Induktion um $55,5 \pm 10,1\%$ des Ausgangswertes ohne Immunsuppressivum. Für einen Spiegel von 3333 ng/ml erfolgte eine Hemmung um $93,6 \pm 1,8\%$. Für die FK506-Spiegel von 22,2 bzw. 200 ng/ml zeigte sich analog eine Inhibition um $56,9 \pm 11,9\%$ bzw. $94,5 \pm 2,4\%$. Ähnliches gilt für die Hemmbarkeit der IL-2-Produktion.

In der späteren Phase der T-Zellaktivierung (Abb. 4) und der akkumulierten Zytokininduktion über achtzehn Stunden (Daten nicht gezeigt) war diese Inhibition von IFN γ und IL-2 durch CsA und FK506 sowohl in CD4- als auch in CD8-T-Zellen analog nachzuvollziehen. Da sich in den 20h-Ansätzen die Hemmwirkung der getesteten Immunsuppressiva analog der Wirkung in der Frühphase der T-Zellaktivierung darstellte, wurde im folgenden zur Analyse der Immunsuppressiva-Wirkstärke auf die Th1-Zytokine IFN γ und IL-2 eine Stimulationsdauer von sechs Stunden mit BFA-Zugabe zwei Stunden nach Stimulationsbeginn herangezogen.

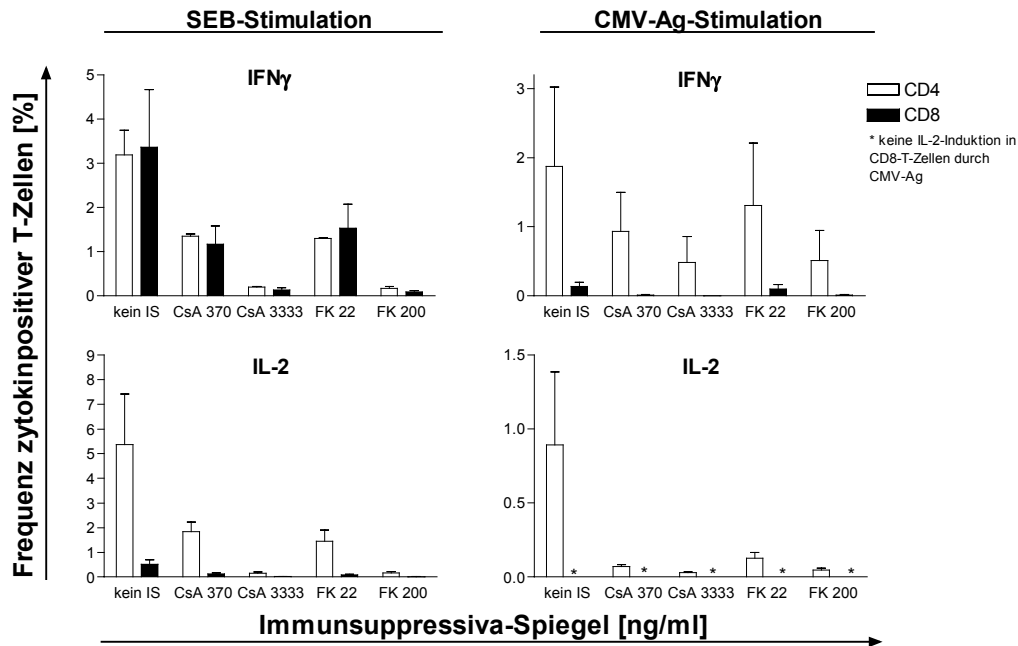


Abbildung 3. Durch Cyclosporin A (CsA) bzw. FK506 läßt sich in der frühen Phase der T-Zellaktivierung die Induktion von IFN γ und IL-2 deutlich und dosisabhängig hemmen. Für jeden Ansatz wurden drei gesunde Probanden untersucht. Es wurden sechsstündige Stimulationen mit SEB bzw. CMV-Ag durchgeführt und bei der Analyse zwischen CD4- und CD8-T-Zellen differenziert. Gegenüber den Ansätzen ohne Immunsuppressivum (jeweils links im Diagramm) zeigte sich bei Zugabe von CsA bzw. FK506 in den angegebenen Dosierungen eine deutliche dosisabhängige Inhibition der untersuchten Th1-Zytokine sowohl in CD4- (weiße Balken) als auch in CD8-T-Zellen (schwarze Balken). Dies galt für SEB-stimulierte und, bei vergleichsweise niedrigerem Frequenzniveau, auch für CMV-Ag-stimulierte Proben. Durch das von uns verwendete CMV-Antigen ließ sich in CD8-T-Zellen kein IL-2 induzieren (rechts unten).

4.3 IL-4 und IL-10 werden auch in unstimulierten T-Zellen exprimiert.

Eine Senkung unter dieses Basisniveau war nicht nachzuweisen.

Um die Frage zu klären, ob in unserer Versuchsanordnung für CsA oder FK506 bei Wirkspiegeln, wie sie in der Klinik eingesetzt werden, ein Einfluß auf die Frequenz von Th2-Zytokinen nachweisbar ist, wurde analog den Versuchen unter 4.2 im folgenden deren Wirkung auf die Zytokine IL-4 und IL-10 untersucht. Im Unterschied zu IFN γ und IL-2 zeigte sich für die Th2-Zytokine IL-4 (Abb. 5A) und IL-10 (Abb. 5B) auch in unstimulierten Proben eine Expression. Hierbei lag die Baseline-Frequenz der IL-4-positiven Zellen im 6h-Ansatz mit durchschnittlich $1,00 \pm 0,45\%$ für CD4-T-Zellen und $0,61 \pm 0,18\%$ für CD8-T-Zellen höher als die Baseline-Frequenz der IL-10-positiven Zellen mit durchschnittlich $0,16 \pm 0,03\%$ für CD4-T-Zellen und $0,10 \pm 0,03\%$ für CD8-T-Zellen (jeweils $n=3$). Ergänzende Experimente zeigten, daß diese Baseline-Expression in CD69-negativen Zellen stattfindet (Daten nicht gezeigt). Nach Stimulation mittels CMV-Ag bzw. SEB traten über diese Basisexpression hinaus weitere IL-4- und IL-10-positive Zellen hinzu, welche positiv für den Aktivierungsmarker CD69 waren (Daten nicht gezeigt). In der frühen Phase der T-Zellaktivierung bewirkte die Stimulation mit SEB einen Anstieg der Frequenz IL-4 positiver Zellen (Abb. 5A) von durchschnittlich $1,00 \pm 0,45\%$ auf $1,33 \pm 0,28\%$ für CD4-T-Zellen und von $0,61 \pm 0,18\%$ auf $0,79 \pm 0,14\%$ für CD8-

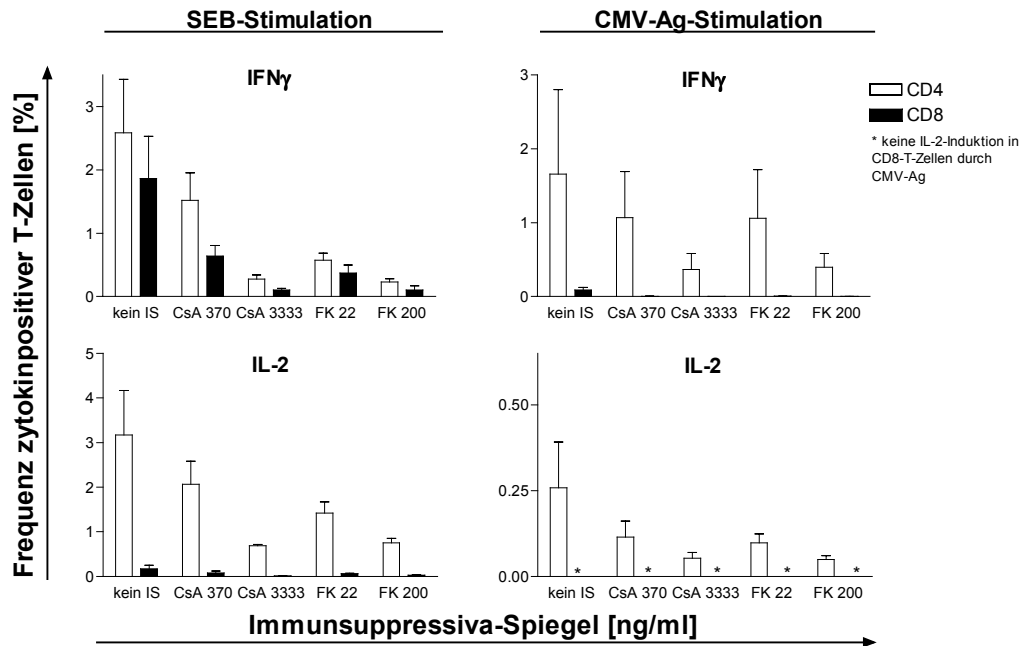


Abbildung 4. In der späten Phase der T-Zellaktivierung sind die dosisabhängigen Hemmeffekte von CsA und FK506 auf die Induktion der Th1-Zytokine IFN γ und IL-2 ebenfalls nachweisbar. Für jeden Ansatz wurden drei gesunde Probanden untersucht. Es wurden zwanzigstündige SEB- bzw. CMV-Ag-Stimulationen mit BFA-Zugabe vier Stunden vor Stimulationsende durchgeführt. Der übrige Versuchsaufbau war analog dem für Abbildung 3 beschriebenen. Auch hier zeigte sich die Induktion von IFN γ (obere Hälfte) und IL-2 (untere Hälfte) durch die beiden untersuchten Calcineurin-Inhibitoren deutlich dosisabhängig hemmbar sowohl nach SEB-Stimulation als auch nach virusspezifischer Stimulation.

T-Zellen. Für IL-10 (Abb. 5B) ergab sich eine Induktion von $0,16 \pm 0,03\%$ auf $0,25 \pm 0,12\%$ für CD4-T-Zellen bzw. von $0,10 \pm 0,03\%$ auf $0,18 \pm 0,09\%$ für CD8-T-Zellen. Somit fiel selbst nach SEB-Stimulation die über die Basisexpression hinausgehende, zusätzliche Induktion von IL-4 und IL-10 sehr gering aus. Nach CMV-Ag-Stimulation war diese noch geringer ausgeprägt (Daten nicht gezeigt). Die Basisexpression von IL-4 und IL-10 in CD69-negativen Zellen ließ sich selbst durch hohe Immunsuppressivaspiegel nicht supprimieren (Daten nicht gezeigt). Eine Wirkung der Calcineurin-Inhibitoren auf die Zusatzinduktion von IL-4 und IL-10 deutete sich in einigen Konstellationen tendentiell an, war jedoch in keinem Falle signifikant. Somit erscheint eine Quantifizierung der Immunsuppressiva-Wirkung anhand dieser Zytokine nicht sinnvoll. In den Ansätzen mit BFA-Wirkung über achtzehn Stunden (Daten nicht gezeigt) und den Ansätzen zur Betrachtung einer späteren Phase der T-Zellaktivierung (Daten nicht gezeigt) war, vermutlich zum einen bedingt durch die relativ hohen Baseline-Frequenzen für IL-4, zum anderen durch Sekundäreffekte wie inkubationsinduzierte Apoptose und Effekte der in den Überstand sezernierten Zytokine, weder eine eindeutige Induktion von IL-4 oder IL-10 durch SEB- oder CMV-Ag-Stimulation noch eine signifikante Reduktion der Frequenz IL-4- oder IL-10-positiver T-Zellen durch CsA oder FK506 nachweisbar. Dies galt sowohl für CD4- als auch für CD8-positive T-Zellen.

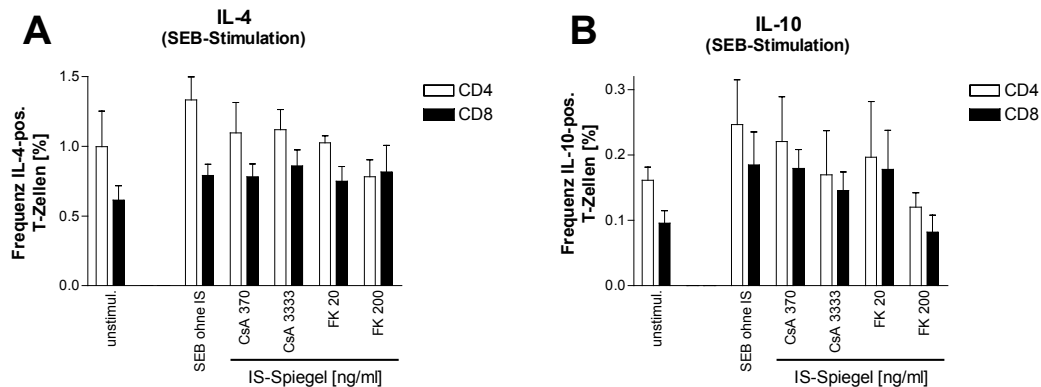


Abbildung 5. Die Th2-Zytokine IL-4 und IL-10 werden auch in unstimulierten T-Zellen exprimiert. Eine Senkung unter diese Basisexpression durch Cyclosporin A oder FK506 war nicht nachweisbar. Die Expression dieser beiden Zytokine in unstimulierten T-Zellen findet in CD69-negativen Zellen statt (Daten nicht gezeigt). Nach Stimulation (hier für SEB-Stimulation gezeigt, n=3) traten CD69-positive IL-4- (A) bzw. IL-10-exprimierende (B) Zellen hinzu. Diese über die Basisexpression hinausgehende Induktion fiel selbst nach SEB-Stimulation schwach aus. Die Basisexpression von IL-4 und IL-10 in CD69-negativen Zellen ließ sich selbst durch hohe Immunsuppressivaspiegel nicht supprimieren. Eine Wirkung der Calcineurin-Inhibitoren auf die Zusatzinduktion von IL-4 und IL-10 deutete sich in einigen Konstellationen tendentiell an, blieb jedoch in unseren Versuchen unterhalb der Signifikanzgrenze.

4.4 CsA und FK506 verringern dosisabhängig die IFN γ -Expressionsstärke auf Einzelzellniveau

Bisher wurde als Parameter für die T-Zellaktivierung und deren Hemmung durch CsA und FK506 die Frequenz zytokinpositiver T-Zellen nach Stimulation betrachtet. Dies erlaubt eine Aussage darüber, wieviele Zellen auf das eingesetzte Stimulans reagieren. Die Stärke der Reaktion läßt sich daraus jedoch nicht zwangsläufig ableiten. So wäre es beispielsweise denkbar, daß zwei unterschiedliche Stimulantien zwar die gleiche Anzahl T-Zellen aktivieren, jedoch im einen Falle zu einer deutlich stärkeren Zytokinexpression führen als im anderen Falle. Auch bei der Hemmung der T-Zellaktivierung durch CsA und FK506 ist es interessant zu untersuchen, wie diese Substanzen die Stärke der Zytokinexpression auf Einzelzellniveau beeinflussen. Calcineurin-Inhibitoren könnten die Aktivierbarkeit einer T-Zelle nach einem Alles-oder-Nichts-Prinzip hemmen, so daß die inhibierten Zellen gar keine Zytokinexpression mehr aufweisen, die nicht inhibierten Zellen hingegen uneingeschränkt Zytokine exprimieren können. Andererseits ist es denkbar, daß diese Substanzen die Stärke der Zytokinexpression pro Zelle vermindern. In diesem Falle würde sich die niedrigere Frequenz reaktiver Zellen dadurch erklären lassen, daß einige Zellen das untersuchte Zytokin unter dem Einfluß von CsA oder FK506 nur noch so schwach exprimieren, daß sie unter die Nachweisgrenze fallen. Während also die Frequenz reaktiver T-Zellen einen Überblick über den Anteil aktivierter Zellen an der gesamten untersuchten T-Zellpopulation gibt, läßt sich über die Stärke der Zytokinexpression pro Zelle eine Aussage über die Reaktivität auf Einzelzellniveau treffen.

In der Durchflußzytometrie steht ein solcher Parameter in Form der mittleren Fluoreszenzintensität (MFI) zur Verfügung. Neben der bisher beschriebenen

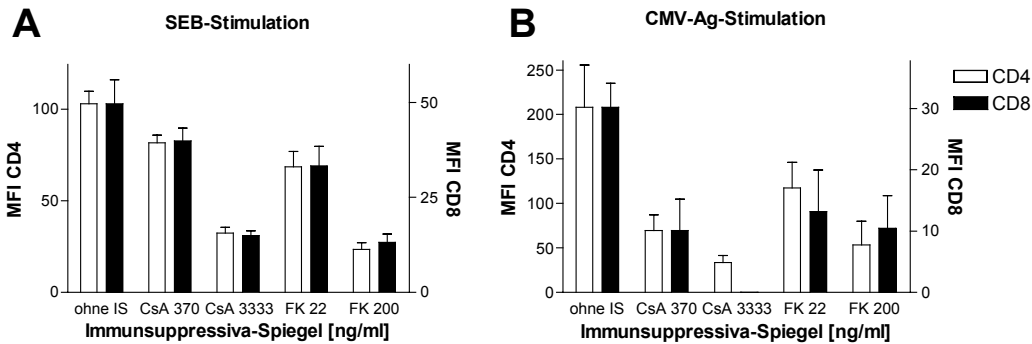


Abbildung 6. CsA und FK506 verringern nicht nur die Frequenz IFN γ -positiver T-Zellen nach Stimulation, sondern auch deren IFN γ -Expressionsstärke auf Einzelzellniveau. Untersucht wurden für jeden Stimulationsansatz jeweils drei gesunde Probanden. Stimuliert wurde mit SEB (A) und CMV-Ag (B). Sowohl für CD4- (weiße Balken) als auch für CD8-positive T-Zellen (schwarze Balken) zeigt sich eine deutliche dosisabhängige Reduktion der mittleren Fluoreszenzintensität (MFI) IFN γ -positiver T-Zellen durch CsA bzw. FK506. Für IL-4 ließ sich dieser Effekt nicht nachweisen (Daten nicht gezeigt).

Immunsuppressiva-Wirkung auf die Frequenz der reaktiven T-Zellen wurde nun ergänzend der Einfluß von CsA und FK506 auf die Stärke der IFN γ - und IL-4-Expression pro Zelle, gemessen anhand der mittleren Fluoreszenzintensität für diese Zytokine, betrachtet. Abbildung 6 zeigt die Immunsuppressiva-Wirkung auf die Expressionsstärke von IFN γ (IFN γ -MFI), getrennt nach CD4- bzw. CD8-T-Zellen für jeweils zwei Konzentrationen von Cyclosporin A und FK506 nach SEB- (Abb. 6A) bzw. CMV-Ag-Stimulation (Abb. 6B) über sechs Stunden nach Standardprotokoll. Untersucht wurden jeweils drei gesunde Probanden. Analog zur Frequenz IFN γ - und IL-2-positiver T-Zellen zeigte sich auch bei der IFN γ -MFI eine deutliche dosisabhängige Reduktion durch FK506 und CsA, sowohl in CMV-Ag- als auch in SEB-stimulierten Ansätzen. Nach SEB-Stimulation von CD4-T-Zellen erfolgte durch einen CsA-Spiegel von 370,3 ng/ml eine Reduktion der IFN γ -MFI um $20,5 \pm 6,6\%$ im Vergleich zur Ausgangs-MFI der SEB-stimulierten Probe ohne Immunsuppressivum. Ein CsA-Spiegel von 3333 ng/ml führte zu einer Reduktion um $68,7 \pm 1,7\%$. Die FK506-Spiegel von 22,2 bzw. 200 ng/ml führten zu einer Hemmung der MFI um $33,8 \pm 6,8\%$ bzw. $77,4 \pm 4,0\%$. Die Zahlen für CD8-T-Zellen verhielten sich ähnlich. Gleiches galt für CMV-Ag-stimulierte Ansätze. Dieser Befund dokumentiert, daß die Hemmwirkung der Immunsuppressiva Cyclosporin A und FK506 sich nicht auf die IFN γ -Induktion im Sinne eines Alles-oder-Nichts-Mechanismus beschränkt, und damit nicht nur die Frequenz der reaktiven T-Zellen senkt, sondern vielmehr auch die Intensität der Expression dieses Zytokines (als Maß für die Stärke der Zellaktivierung) auf Einzelzellniveau verringert. Für IL-4 ließ sich kein inhibitorischer Effekt von CsA oder FK506 auf die MFI erkennen (Daten nicht gezeigt).

4.5 Detektion der T-zellvermittelten Monozytenlyse als Parameter für die zytotoxische T-Zellaktivität

Es sind zwei Effektorfunktionen von T-Zellen zu unterscheiden: Zytokinproduktion und Zytotoxizität. Zur Charakterisierung der Wirkung von Calcineurin-Inhibitoren ist es von

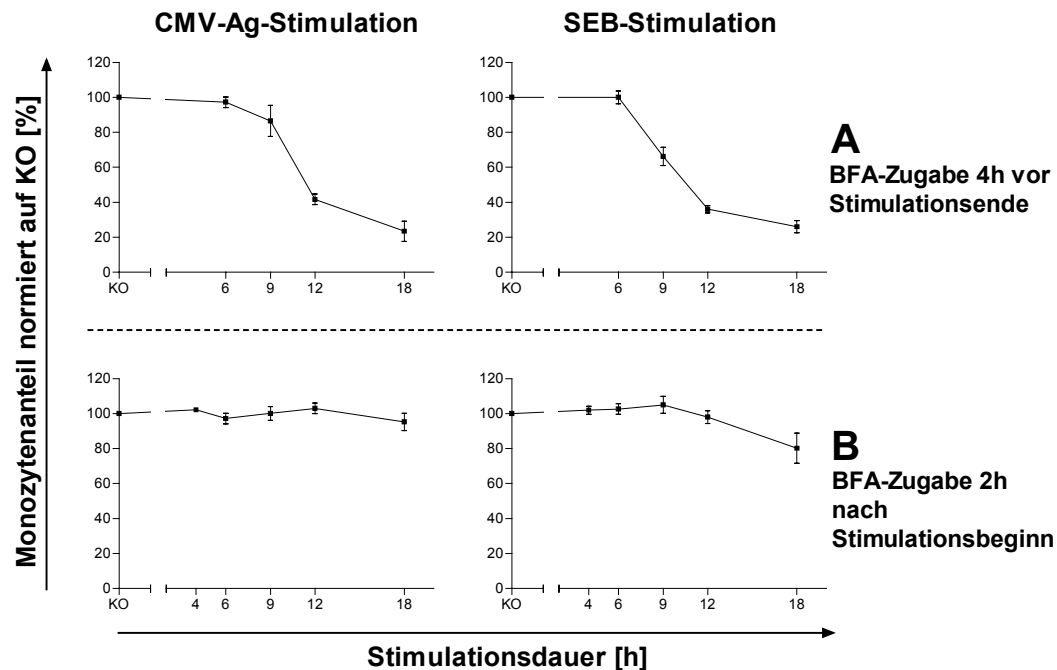


Abbildung 7. Mit zunehmender Stimulationsdauer sinkt der Anteil der Monozyten im Stimulationsansatz zusehends. Je länger die ungestörte (A) CMV- bzw. SEB-Stimulation andauert, desto mehr Monozyten werden durch zytotoxische T-Zellen lysiert. Durch Zugabe von Brefeldin A zwei Stunden nach Stimulationsbeginn (B) wird ab diesem Zeitpunkt die weitere Antigenprozessierung und -präsentation sowie die Ausschleusung zytotoxischer Vesikel, und damit die Zielzellyse, gestört. In der Folge bleibt der Anteil an Monozyten im Ansatz praktisch über alle untersuchten Stimulationszeiten konstant. Dies demonstriert, daß der in der oberen Hälfte der Abbildung dargestellte Monozytenverlust nicht eine Folge der langen Stimulationsdauer per se ist.

wobei auf den Anteil der Monozyten im Kontrollansatz (unstimuliert oder stimuliert mit CMV-Kontroll-Ag) normiert wurde. Untersucht wurden jeweils vier gesunde Probanden für die SEB-stimulierten Ansätze und zwei gesunde Probanden für die CMV-Ag-stimulierten Ansätze. Man erkennt einen deutlichen Abfall des Monozytenanteils mit zunehmender Dauer der ungestörten Antigenpräsentation. Zur Klärung der Frage, ob diese Beobachtung tatsächlich den aktiven Prozeß der T-zellvermittelten Lyse von Targetzellen widerspiegelt, wurde im folgenden bei denselben Probanden der zeitliche Verlauf des Monozytenanteils bei einer konstanten ungestörten Antigenpräsentationszeit von 2 Stunden betrachtet. Als Stimulationsdauer wurden 4h, 6h, 9h, 12h und 18h ausgewählt, wobei jeweils zwei Stunden nach Stimulationsbeginn die Zugabe von BFA erfolgte. Hierdurch wird zum einen eine weitere Prozessierung und Präsentation von Antigenen inhibiert, zum anderen stört das BFA die Lyse von Targetzellen durch Lymphozyten, indem es die Ausschleusung lysierender Vesikel unterbindet (DINTER, BERGER, 1998). In Abbildung 7B sind die entsprechenden Daten für CMV-Ag-stimulierte Ansätze (links) und SEB-stimulierte Ansätze (rechts) dargestellt, auch hier normiert auf den Monozytenanteil im Kontrollansatz. Erwartungsgemäß blieb der Anteil an Monozyten im Ansatz bei dieser Versuchsanordnung fast im gesamten Verlauf konstant. Hieraus läßt sich schlußfolgern, daß die oben beschriebene Reduktion des Monozytenanteils das direkte Korrelat der T-zellvermittelten Lyse ist. Mit dem beschriebenen Versuchsaufbau läßt sich somit Zytotoxizität messen.

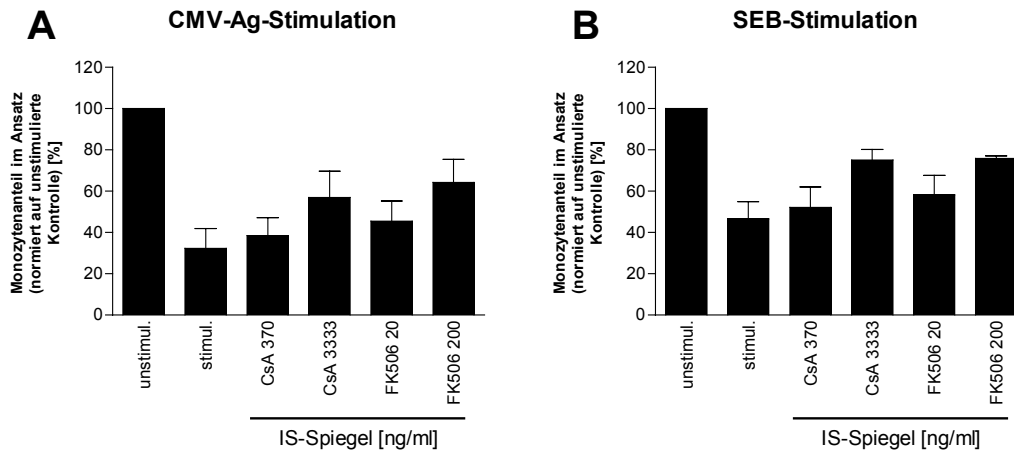


Abbildung 8. Cyclosporin A und FK506 hemmen dosisabhängig die Fähigkeit zytotoxischer T-Zellen zur Monozytenlyse. Untersucht wurden Vollblutproben von je 3 gesunden Probanden nach zwanzigstündiger Stimulation mit CMV-Ag (A) bzw. SEB (B). Den Ansätzen wurde entweder kein Immunsuppressivum zugegeben, oder sie wurden mit der angegebenen Dosis Immunsuppressivum vorinkubiert. Zur Kontrolle dienten Ansätze, die ohne Zusatz von Stimulans zwanzig Stunden inkubiert wurden (jeweils ganz links). Auf den Monozytenanteil in diesen Kontrollansätzen wurde hier normiert. Sowohl nach CMV-Ag- als auch nach SEB-Stimulation hemmten die getesteten Calcineurin-Inhibitoren dosisabhängig das Ausmaß der T-zellvermittelten Zytotoxizität.

4.5.2 CsA und FK506 hemmen dosisabhängig die Fähigkeit zytotoxischer T-Zellen zur Monozytenlyse

Um zu klären, wie die Immunsuppressiva Cyclosporin A und FK506 auf die beobachtete Zytotoxizität der T-Zellen wirken, wurden im folgenden CMV- und SEB-Stimulationen von zwanzigstündiger Dauer betrachtet, bei denen die BFA-Zugabe jeweils vier Stunden vor Stimulationsende erfolgte, um eine lange, ungestörte Antigenpräsentation und Entfaltung der T-zellulären Zytotoxizität zu ermöglichen. Die BFA-Zugabe vier Stunden vor Stimulationsende wurde durchgeführt, um in diesen Ansätzen parallel die Zytokininduktion in den T-Zellen auswerten zu können. Untersucht wurden jeweils drei gesunde Probanden. Die eingesetzten Immunsuppressivspiegel waren hierbei für Cyclosporin A 370,3 ng/ml bzw. 3333 ng/ml und für FK506 22,2 ng/ml bzw. 200 ng/ml.

Der mittlere Monozytenanteil in den Ansätzen mit Ko-Ag betrug $8,12 \pm 1,82\%$ (Abb. 8A, Balken links außen). Durch CMV-Ag-Stimulation ging dieser zurück auf $2,78 \pm 1,97\%$. Bei Vorinkubation mit 370,3 ng/ml CsA lag der Monozytenanteil am Ende der Stimulation bei $3,31 \pm 2,04\%$, bei Vorinkubation mit 3333 ng/ml CsA lag er bei $4,81 \pm 2,71\%$. FK506-Vorinkubation mit einem Spiegel von 22,2 ng/ml führte zu einem Monozytenanteil von $3,84 \pm 2,13\%$. Ein FK506-Spiegel von 200 ng/ml führte zu einem Monozytenanteil von $5,4 \pm 2,76\%$ am Ende der Stimulation. Ähnliches gilt für SEB (Abb. 8B): Der mittlere Monozytenanteil in unstimulierten Ansätzen betrug $8,49 \pm 1,42\%$. Durch SEB-Stimulation ging dieser auf $3,97 \pm 1,49\%$ zurück. Bei Vorinkubation mit 370,3 ng/ml CsA lag der Monozytenanteil am Ende der Stimulation bei $4,46 \pm 1,88\%$, bei Vorinkubation mit 3333 ng/ml

	CsA [ng/ml]	FK506 [ng/ml]
Subtherapeutischer Spiegel	41,1	2,5
Talspiegel	123,4	7,4
Mittlerer Wirkspiegel	370,3	22,2
Hoher Spitzenspiegel	1111	66,7
Supratherapeutischer Spiegel	3333	200

Tabelle 4. Konzentrationen der Calcineurin-Inhibitoren zur Charakterisierung der Dosis-Wirkungs-Beziehungen.

lag er bei $6,4 \pm 1,56\%$. FK506-Vorinkubation mit einem Spiegel von 22,2 ng/ml führte zu einem Monozytenanteil von $4,97 \pm 1,87\%$. Ein FK506-Spiegel von 200 ng/ml führte zu einem Monozytenanteil von $6,43 \pm 1,01\%$ am Ende der Stimulation.

Es zeigte sich somit zum einen eine deutliche Reduktion des Monozytenanteils in den CMV-Ag- bzw. SEB-stimulierten Ansätzen gegenüber den Kontrollansätzen (Kontroll-Ag bzw. unstimuliert). Weiterhin ließ sich durch CsA bzw. FK506 diese Monozytenreduktion deutlich und dosisabhängig inhibieren. Analog der Wirkung von CsA und FK506 auf die IFN γ - und IL-2-Induktion in T-Zellen war hiermit auch deren Wirkung auf eine weitere Effektorfunktion, die Zytotoxizität der T-Lymphozyten, nachweisbar.

4.6 Charakterisierung der Dosis-Wirkungs-Beziehungen für Cyclosporin A und FK506

Nachdem gezeigt wurde, daß der vorliegende Vollblut-Assay eine Hemmung der T-zellulären Zytokinexpression durch klinisch bedeutsame Spiegel von Cyclosporin A und FK506 nachweisen kann, sollte im folgenden die Dosis-Wirkungs-Beziehung für diese beiden Substanzen näher charakterisiert werden. Hierbei wurden die Calcineurin-Inhibitoren in den in Tabelle 4 angegebenen Konzentrationen eingesetzt [die Bezeichnungen wie "mittlerer Wirkspiegel" etc. orientieren sich an den in der Literatur beschriebenen Kinetiken der Calcineurin-Inhibitoren (AUMENTE RUBIO et al., 2003; KNOOP et al., 2003) und dienen lediglich der groben Einordnung]. Untersucht wurde das Zytokin IFN γ auf Grund seiner Bedeutung bei der Vermittlung akuter Abstoßungsreaktionen (DALLMAN, 1995; MATESIC et al., 1998; HEEGER et al., 1999; NAJAFIAN et al., 2002) und seiner deutlichen Expression und damit reproduzierbaren Auswertbarkeit. Die Stimulation erfolgte über sechs Stunden nach Standardprotokoll. Als Stimulantien kamen CMV-Ag (n=3) und SEB (n=3) zum Einsatz. Während CMV-spezifisch aktivierte CD4-T-Zellen sich in ihrer IFN γ -Expression recht deutlich

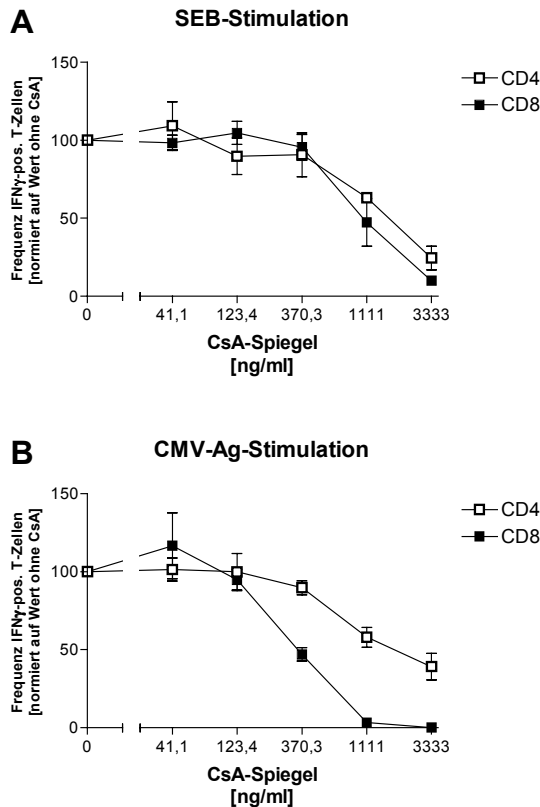


Abbildung 9. Dosis-Wirkungs-Beziehung für Cyclosporin A auf die Induktion von IFN γ in T-Zellen nach SEB- bzw. CMV-Ag-Stimulation. Nach SEB-Stimulation (A) sieht man eine deutliche, dosisabhängige Inhibition der IFN γ -Expression durch CsA. Die Dosis-Wirkungs-Kurve zeigt hierbei einen charakteristischen sigmoiden Verlauf. Dies gilt sowohl für CD4- als auch für CD8-positive T-Zellen. Auch nach hochspezifischer CMV-Ag-Stimulation (B) erkennt man diese sigmoide Dosis-Wirkungs-Beziehung.

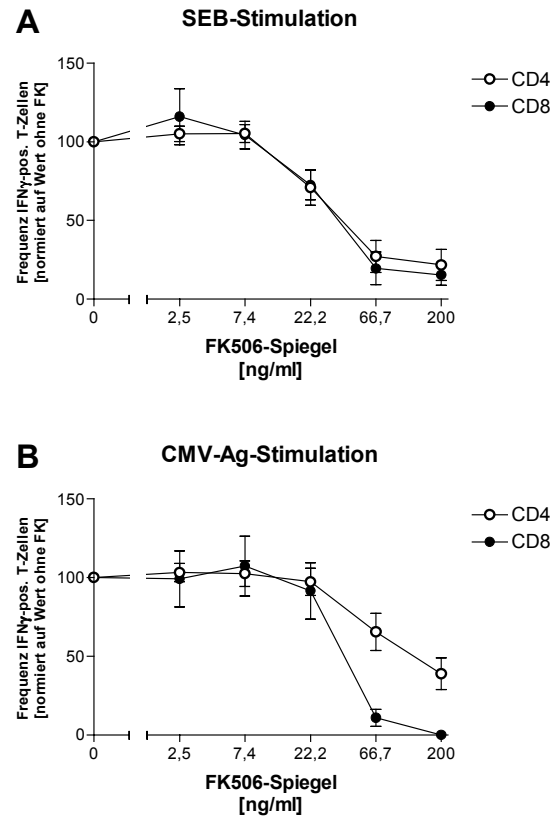


Abbildung 10. Dosis-Wirkungs-Beziehung für FK506 auf die Induktion von IFN γ in T-Zellen nach SEB- bzw. CMV-Ag-Stimulation. Genau wie für CsA zeigt sich auch für FK506 nach SEB-Stimulation (A) eine deutliche, dosisabhängige Inhibition der IFN γ -Expression mit sigmoidem Verlauf. Auch in CMV-Ag-stimulierten Ansätzen (B) beobachtet man diese sigmoide Dosis-Wirkungs-Beziehung.

von der Population der nicht aktivierten, IFN γ -negativen T-Zellen abheben, bilden SEB-stimulierte Zellen in ihrer IFN γ -Expressionsstärke eher ein Kontinuum aus, das sich von IFN γ -negativen über schwach IFN γ -positive bis hin zu stark IFN γ -positiven T-Zellen erstreckt (Daten nicht gezeigt). In dieser Hinsicht ähnelt die SEB-Stimulation in ihrem IFN γ -Expressionsmuster demjenigen bei der allogenen Stimulation, wie sie im zweiten Teil dieser Arbeit beschrieben ist. In den folgenden Experimenten sollte daher die Wirkung der Immunsuppressiva CsA und FK506 auf einerseits eine virusspezifische Immunantwort und andererseits auf die SEB-Antwort als mögliches Modell für eine allogene Immunreaktion verglichen werden.

4.6.1 Dosis-Wirkungs-Beziehung für Cyclosporin A und FK506

Die Dosis-Wirkungs-Kurve für Cyclosporin A zeigte für SEB-stimulierte Zellen (Abb. 9A) eine deutliche, dosisabhängige Hemmung der IFN γ -Induktion mit charakteristischem sigmoiden Verlauf. Dies galt sowohl für CD4- als auch für CD8-T-Zellen. Diese sigmoide Dosis-

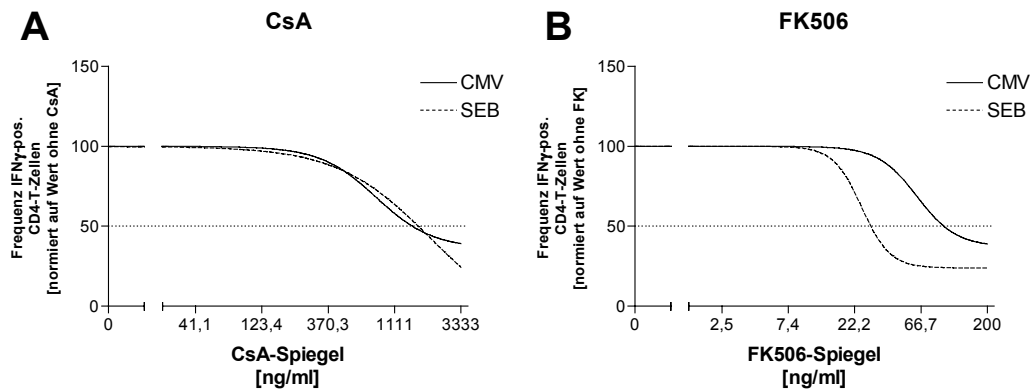


Abbildung 11. Vergleich des Wirkprofils von Cyclosporin A und FK506 in Abhängigkeit von der Stimulationsart. Gezeigt ist die Wirkung auf die IFN γ -Induktion in CD4-T-Zellen nach CMV-Ag- bzw. SEB-Stimulation. Die Dosis-Wirkungs-Kurven von Cyclosporin A verlaufen für CMV-Ag- und SEB-stimulierte Ansätze über weite Strecken praktisch deckungsgleich (A). Im Gegensatz dazu weichen die entsprechenden Kurven von FK506 (B) deutlich voneinander ab. Im Falle von FK506 setzt die Inhibition der CD4-T-Zellen nach SEB-Stimulation bereits bei deutlich niedrigeren Konzentrationen ein als nach viruspezifischer Stimulation.

Wirkungs-Beziehung war ebenfalls nach hochspezifischer CMV-Ag-Stimulation nachzuvollziehen (Abb. 9B). Auch die Dosis-Wirkungs-Kurve für FK506 zeigte nach SEB-Stimulation für CD4- und CD8-T-Zellen eine deutliche, dosisabhängige Hemmung der IFN γ -Induktion mit sigmoidem Verlauf (Abb. 10A). Ebenso in CMV-Ag-stimulierten Ansätzen war diese sigmoide Beziehung für FK506 zu beobachten (Abb. 10B).

4.6.2 FK506 besitzt eine höhere molare Wirkstärke als Cyclosporin A. Das Wirkprofil der beiden Calcineurin-Inhibitoren unterscheidet sich außerdem je nach verwendetem Stimulans

Die erstellten Dosis-Wirkungs-Kurven für CsA und FK506 wurden mittels nichtlinearer Regression analysiert und die jeweiligen Immunsuppressiva-Konzentrationen bestimmt, bei denen eine Inhibition auf 50% der T-Zell-Reaktivität in bezug auf die T-Zell-Reaktivität ohne Zugabe von Immunsuppressivum erfolgt (IC₅₀-Werte). Da das verwendete CMV-Ag als extrazelluläres Komplettantigen bei seiner Prozessierung und Präsentation besser in den MHC-II- als in den MHC-I-Weg eingeschleust wird und dadurch suffizienter CD4- als CD8-T-Zellen stimuliert, werden im folgenden für die quantitative Auswertung die CD4-positiven T-Zellen herangezogen:

Für CsA (Abb. 11A) betrug bei CD4-T-Zellen die IC₅₀ nach CMV-Ag-Stimulation 1488,56 ng/ml (1,24 μ mol/l). Nach SEB-Stimulation betrug sie 1642 ng/ml (1,37 μ mol/l). Für FK506 (Abb. 11B) betrug bei CD4-T-Zellen die IC₅₀ nach CMV-Ag-Stimulation 97,31 ng/ml (0,12 μ mol/l). Nach SEB-Stimulation betrug sie 29,1 ng/ml (0,035 μ mol/l). Bemerkenswert ist, daß die Dosis-Wirkungs-Kurven von Cyclosporin A für CMV-Ag- und SEB-stimulierte Ansätze (Abb. 11A) über weite Strecken praktisch deckungsgleich verlaufen. Im Gegensatz dazu weichen die entsprechenden Kurven von FK506 deutlich voneinander ab (Abb. 11B). Im Falle

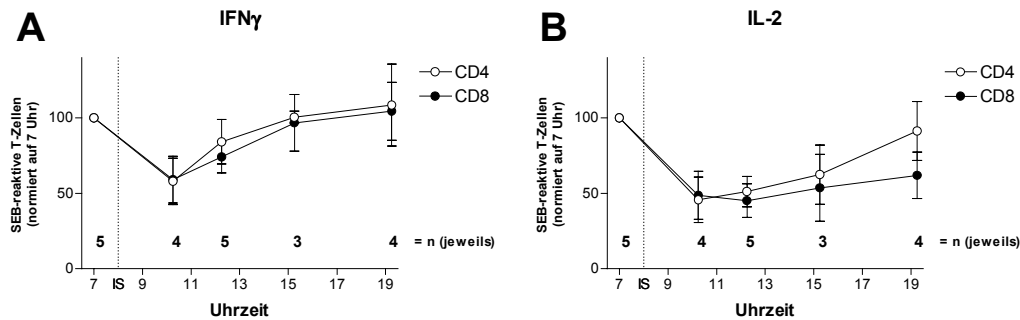


Abbildung 12. Auch nach *in vivo* eingestellten CsA- und FK506-Spiegeln lässt sich mit dem verwendeten Kurzzeit-Assay die Hemmung der IFN γ - und IL-2-Induzierbarkeit nachweisen. Untersucht wurden Vollblutproben von Nierentransplantatempfängern, die entweder CsA oder FK506 einnahmen, zu den angegebenen Zeitpunkten im Tagesverlauf. Die Einnahme der Calcineurin-Inhibitoren erfolgte hierbei jeweils um 8 Uhr und 20 Uhr. Die Zahl der zu jedem Meßzeitpunkt analysierten Proben ist der Abbildung zu entnehmen.

von FK506 setzt die Inhibition der CD4-T-Zellen nach SEB-Stimulation bereits bei deutlich niedrigeren Konzentrationen ein bzw. fällt bei gleichen Konzentrationen stärker aus als nach virusspezifischer Stimulation. Durch die Angabe der IC_{50} in Molaritäten wird ein Vergleich der Wirkstärke der beiden Immunsuppressiva untereinander möglich. Es zeigte sich, daß FK506 für beide Stimulanzen CD4-T-Zellen potenter hemmte als CsA. Anhand der IC_{50} beurteilt wirkte FK506 nach CMV-Ag-Stimulation auf CD4-T-Zellen 10,5 mal stärker inhibierend als CsA. In SEB-stimulierten Ansätzen wirkte FK506 auf CD4-T-Zellen 38,6 mal stärker hemmend als CsA.

4.7 Auch nach *in vivo* eingestellten CsA- und FK506-Spiegeln lässt sich mit dem verwendeten Kurzzeit-Assay die Hemmung der IFN γ - und IL-2-Induzierbarkeit nachweisen

Nachdem wir *in vitro* zeigen konnten, daß die Wirkung von Cyclosporin A und FK506 mittels des beschriebenen Vollblutassays im Bereich klinisch relevanter Wirkspiegel analysiert werden kann, war das Ziel der folgenden Experimente zu klären, ob sich diese Beobachtungen mit *in vivo* eingestellten CsA- bzw. FK506-Spiegeln reproduzieren lassen. Hierzu wurden von fünf nierentransplantierten Patienten, die entweder Cyclosporin A oder FK506 einnahmen, venöse Blutproben entnommen. Dies geschah morgens um 7 Uhr vor der Medikamenteneinnahme, die um 8 Uhr erfolgte, sowie zu mehreren Zeitpunkten danach (10:15 Uhr, 12:15 Uhr, 15:15 Uhr und 19:15 Uhr). Diese Proben wurden nach Standardprotokoll auf ihren Anteil reaktiver T-Lymphozyten untersucht, wobei die Zytokin-Induktion nach CMV-Ag- (Daten nicht gezeigt) bzw. SEB-Stimulation als Meßparameter diente. Parallel wurden Spiegelbestimmungen für Cyclosporin A bzw. FK506 durchgeführt. Aus organisatorischen Gründen lagen nicht zu allen Zeitpunkten von jedem der fünf Patienten Blutproben vor. Abbildung 12 zeigt den Verlauf der T-zellulären Reaktivität dieser Patienten nach SEB-Stimulation im Tagesverlauf, dargestellt als Frequenz der reaktiven, IFN γ - (Abb.

12A) bzw. IL-2- (Abb. 12B) produzierenden T-Zellen, normiert auf den morgendlichen Wert vor Immunsuppressivaeinnahme. Wie bereits *in vitro* demonstriert, so spiegelte der verwendete Assay auch die Wirkung von *in vivo* eingestellten Immunsuppressivaspiegeln wider, und zwar ebenfalls auf die Induktion der Zytokine IFN γ und IL-2. Eine eindeutige Wirkung auf die Frequenz IL-4- und IL-10-positiver T-Zellen war *in vivo* nicht nachweisbar (Daten nicht gezeigt). Der Spiegelverlauf der Calcineurin-Inhibitoren verhielt sich erwartungsgemäß umgekehrt zur IFN γ - und IL-2-Induzierbarkeit (Daten nicht gezeigt). Zur Kontrolle wurde bei gesunden Probanden, welche keine Immunsuppressiva einnahmen, die Induzierbarkeit von IFN γ und IL-2 in T-Zellen nach SEB-Stimulation im Tagesverlauf untersucht. Hier zeigte sich erwartungsgemäß kein Einbruch der T-Zell-Reaktivität (Daten nicht gezeigt).

TEIL 2

In der Organtransplantation können kreuzreagierende Effektor-T-Zellen über den Weg der direkten Alloantigenerkennung eine akute Abstoßung vermitteln. In Ermangelung eines geeigneten Assays entzieht sich das individuelle Repertoire alloreaktiver T-Zellen des Empfängers, geformt durch die gesamte bisherige Immunanamnese (frühere Infektionen, Blut-/Blutprodukttransfusionen, Schwangerschaften etc.), bislang der routinemäßigen Analyse.

4.8 Alloreaktive T-Zellen lassen sich innerhalb von sechs Stunden mittels Durchflußzytometrie nachweisen

Um präformierte alloreaktive T-Zellen detektieren zu können, wurde ein klinisch einsetzbarer, durchflußzytometrischer *in-vitro*-Kurzzeit-Assay erarbeitet, welcher auf dem Prinzip der Analyse intrazellulär akkumulierter Zytokine beruht, wie es auch für die Experimente im ersten Teil dieser Arbeit beschrieben ist. Bei den folgenden Versuchen wurden jedoch allospezifische Stimulationen durchgeführt und das Stimulationsprotokoll dementsprechend modifiziert. Anstelle von Vollblut wurde mit isolierten PBMC gearbeitet, um den Einfluß störender Faktoren, beispielsweise evtl. im Ansatz befindlicher präformierter alloreaktiver Antikörper, möglichst gering zu halten. Darüber hinaus zeigte sich in Vorversuchen, daß sich durch PBMC-Stimulationen geringere Leerwertfrequenzen erzielen ließen als bei Vollblutstimulationen (Daten nicht gezeigt). Um die Situation einer Alloreaktion nachzubilden, wurden PBMC von zufälligen Paar-Kombinationen gesunder Probanden als „Spender-“ bzw. „Empfängerzellen“ verwandt. Für jede Reaktion wurden 1 Mio. Spenderzellen mit 1 Mio. Empfängerzellen zusammengeführt und die spezifische Induktion von IFN γ in den T-Zellen jedes der beiden Probanden nach sechsstündiger Stimulation analysiert. Um optimalen Zell-Zell-Kontakt zu gewährleisten, wurden die Ansätze während der ersten zwei Stunden dreimal resuspendiert und zentrifugiert. Durch dieses Vorgehen konnte die gemessene Frequenz

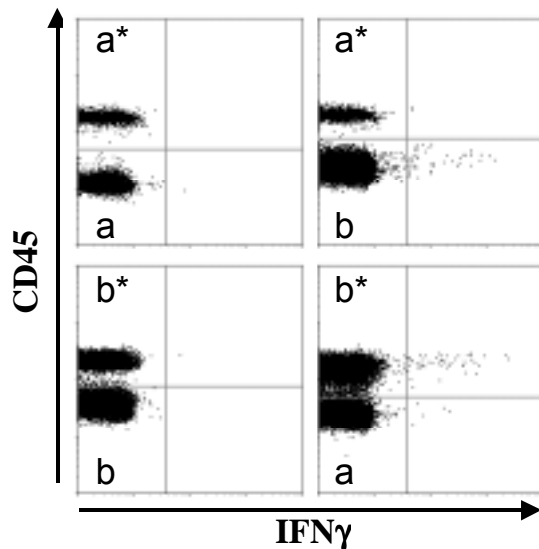


Abbildung 13. Messung alloreaktiver CD8-positiver T-Zellen mittels Durchflußzytometrie. Alloreaktive CD8-T-Zellen des Probanden „b“, welche gegen Zellen des Probanden „a“ reagieren, sind deutlich nachweisbar, während nur geringfügige Alloreaktivität des Probanden „a“ gegen PBMC des Probanden „b“ nachweisbar ist (rechte Hälfte der Abbildung). Vor jeder Stimulation wurden die PBMC jeweils eines der beiden Probanden mit einem monoklonalen Antikörper gegen CD45 vorgefärbt (durch „*“ markiert). Diese Vorfärbung beeinflusste nicht die T-Zell-Reaktivität (rechte Hälfte der Abbildung: Proband b 43 (ungefärbt) vs. 42 (vorgefärbt) alloreaktive IFN γ ⁺/10⁴ CD8-T-Zellen; Proband a 5 (ungefärbt) vs. 6 (vorgefärbt) alloreaktive IFN γ ⁺/10⁴ CD8-T-Zellen; und Daten nicht gezeigt). Die jeweiligen autologen Kontrollstimulationen zeigten keine signifikante Reaktivität (linke Hälfte der Abbildung: a* gegen a und b* gegen b).

alloreaktiver T-Zellen ohne Einbuße an Spezifität erhöht werden (Daten nicht gezeigt). Um die Zellen der beiden Probanden bei der Analyse unterscheiden zu können, wurden die Zellen einer Person vor Stimulationsbeginn mit einem Fluorescein-Isothiocyanat-konjugierten Antikörper gegen den Pan-Leukozyten-Marker CD45 vorgefärbt. Abbildung 13 zeigt dies repräsentativ für eine Probandenkonstellation. Man erkennt eine signifikante Fraktion von CD8-T-Zellen des Probanden „b“, die gegen PBMC des Probanden „a“ reagieren, während kaum CD8-Zellen des Probanden „a“ gegen PBMC des Probanden „b“ reagieren. Gleichzeitig sieht man keine relevante Reaktivität in den Kontrollstimulationen mit autologen Zellen (linke Hälfte: „a“ gegen „a*“ bzw. „b“ gegen „b*“). Die Vorfärbung mit α CD45 beeinflusste nicht die Gesamtreaktivität der T-Zellen des betreffenden Probanden (in Abb. 13 repräsentativ dargestellt, rechte Hälfte, Proband b: 42 IFN γ ⁺/10⁴ CD8-T-Zellen [vorgefärbt, b*] gegenüber 43 [ungefärbt, b]; Proband a: 6 IFN γ ⁺/10⁴ CD8-T-Zellen [vorgefärbt, a*] gegenüber 5 [ungefärbt, a]; und Daten nicht gezeigt). Auch die T-Zell-Reaktivität nach Stimulation mit Superantigen oder viralem Antigen wurde durch α CD45-Vorfärbung nicht beeinflusst (Daten nicht gezeigt). In der Subpopulation der CD4-T-Zellen ließ sich ebenfalls Alloreaktivität detektieren, jedoch lagen die beobachteten Frequenzen hier durchweg unter denen für CD8-positive T-Zellen (Abb. 15).

Alloreaktive T-Zellen lassen sich somit nach nur sechsstündiger Stimulation auf einfache Weise mittels Durchflußzytometrie detektieren. Eine Unterscheidung der beiden beteiligten Probanden gelingt problemlos durch Vorfärbung der Zellen eines der Probanden mit fluorochromgekoppeltem α CD45-Antikörper.

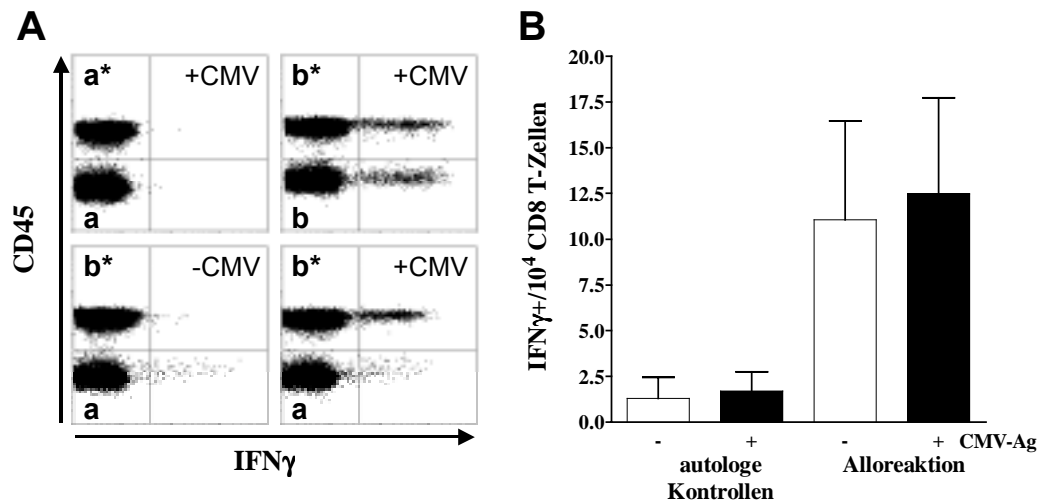


Abbildung 14. Die gemessene Alloreaktivität wird nicht durch unspezifische Bystander-Aktivierung verfälscht. (A) Die starke CMV-Ag-spezifische T-Zell-Reaktion des CMV-positiven Probanden b beeinflusste nicht die gemessene Frequenz alloreaktiver T-Zellen des CMV-negativen Probanden a gegen die Zellen des Probanden b (23 IFNγ⁺/10⁴ CD8-T-Zellen, unten links, vs. 28 IFNγ⁺/10⁴ CD8-T-Zellen, unten rechts). (B) Neun unabhängige Experimente wurden analog zu Abbildung A durchgeführt. Gezeigt sind hier die autologen Kontrollen sowie die alloreaktiven CD8-T-Zellfrequenzen CMV-seronegativer Probanden gegen PBMC CMV-seropositiver Probanden in Stimulationsansätzen ohne (-) oder mit (+) Zugabe von CMV-Antigen.

4.9 Die gemessene Alloreaktivität ist nicht durch unspezifische Bystander-Aktivierung beeinflusst

Spezifisch aktivierte T-Zellen können potentiell über eine unspezifische Bystander-Aktivierung benachbarter Zellen die Frequenz reaktiver T-Zellen im untersuchten Ansatz erhöhen und dadurch zu einer Überschätzung der tatsächlichen Alloreaktivität führen. Dies fällt umso mehr ins Gewicht, je länger die Stimulationsdauer des verwendeten Assays ist. Um die Bedeutung unspezifischer Bystander-Aktivierung im vorgestellten Assay zu beurteilen, wurde der Einfluß einer starken, antigenspezifischen T-Zell-Aktivierung auf die gemessene alloreaktive Frequenz analysiert. Wie in Abbildung 14A gezeigt, wurde hierzu die Alloreaktion mit 1 Mio. PBMC eines CMV-seropositiven Probanden (b) und 1 Mio. PBMC eines CMV-seronegativen Probanden (a) durchgeführt, einmal unter Zugabe von CMV-Komplettantigenen und einmal ohne zusätzliche CMV-Ag-Stimulation. In den rein autologen Stimulationen ("a" gegen "a*" bzw. "b" gegen "b*") ist zu erkennen, daß die Zugabe von CMV-Ag zu einer starken Aktivierung der T-Zellen des CMV-seropositiven Probanden "b" führt, während diese beim CMV-seronegativen Probanden "a" ausbleibt. Ohne CMV-Ag-Zugabe ist auch in der autologen Stimulation des Probanden "b" keine relevante IFNγ-Expression nachzuweisen (Daten nicht gezeigt). In der eigentlichen Alloreaktion (Abbildung 14A, untere Hälfte) erkennt man eine deutliche Aktivierung der CD8-T-Zellen des Probanden "a" (23 IFNγ⁺/10⁴ CD8-T-Zellen) gegen die PBMC des Probanden "b" (links unten). Weiterhin erkennt man, daß durch die Zugabe von CMV-Ag, wie bereits in der autologen Stimulation, in den CD8-T-Zellen des Probanden "b" eine starke Aktivierung ausgelöst wird (rechts unten). Beachtenswert ist hierbei, daß diese starke T-Zell-Aktivierung die Frequenz der allospezifisch aktivierten Zellen

des Probanden "a" nicht signifikant beeinflusst ($28 \text{ IFN}\gamma^+/10^4$ CD8-T-Zellen). Vergleichbare Ergebnisse wurden in insgesamt 9 Experimenten mit verschiedenen Kombinationen CMV-positiver und CMV-negativer Probanden beobachtet (Abb. 14B). Auch für CD4-T-Zellen zeigte sich kein Hinweis auf Bystander-Aktivierung (Daten nicht gezeigt).

Zusammengenommen läßt sich sagen, daß das Phänomen der Bystander-Aktivierung keinen Einfluß auf die gemessene Frequenz alloreaktiver T-Zellen in diesem Kurzzeit-Assay nimmt. Darüber hinaus erlaubt der Assay eine akkurate Quantifizierung alloreaktiver T-Zellen sowohl in der Spender als auch in der Empfängerpopulation.

4.10 Zirkulierende, präformierte alloreaktive T-Zellen finden sich vornehmlich in der Population der CD8-positiven T-Zellen

Um das Ausmaß und das Verteilungsmuster direkt alloreaktiver T-Zellen näher zu charakterisieren, wurden die Frequenzen alloreaktiver CD4- und CD8-T-Zellen in 128 unabhängigen Paar-Kombinationen aus 41 Personen analysiert (Abb. 15). Zur Berechnung der Frequenz spezifisch alloreaktiver T-Zellen eines Probanden wurde die Frequenz IFN γ -positiver T-Zellen in der autologen Kontrollstimulation dieses Probanden von der Frequenz IFN γ -positiver T-Zellen in der allogenen Stimulation subtrahiert. Um bestimmen zu können, ab welcher gemessenen Frequenz man von spezifischer Alloreaktivität ausgehen kann, mußten für den verwendeten Assay zunächst die Detektionsgrenzen festgelegt werden. Hierzu wurden für 18 Probanden autologe Stimulationen in jeweils doppelter Ausführung durchgeführt. Die Variabilität, das heißt die Differenz zwischen den beiden Kontrollfrequenzen eines jeden Probanden, zeigte eine Normalverteilung um Null. Die Standardabweichung der Variabilität für CD4-T-Zellen ($0,1 \pm 1,4 \text{ IFN}\gamma^+/10^4$) war hierbei kleiner als die Standardabweichung für CD8-T-Zellen ($0,8 \pm 6,05 \text{ IFN}\gamma^+/10^4$). Um das 95%-Konfidenzintervall abzudecken, legten wir die Detektionsgrenzen als die doppelte Standardabweichung der Variabilität fest. Somit ergab sich als Detektionsgrenze $2,8 \text{ IFN}\gamma^+/10^4$ für CD4-T-Zellen bzw. $12,1 \text{ IFN}\gamma^+/10^4$ für CD8-T-Zellen. Alloreaktivität über der jeweiligen Detektionsgrenze wurde sowohl bei CD4- als auch bei CD8-T-Zellen beobachtet. Der Anteil der Probanden mit alloreaktiven T-Zellen war für CD4- (28,1%, 36 Probanden, Abb. 15A u. 15C) und CD8-T-Zellen (35,9%, 46 Probanden, Abb. 15B u. 15C) ähnlich. Auffällig war jedoch, daß die Frequenzen alloreaktiver T-Zellen in der CD8-Population signifikant höher waren und eine deutlich breitere Streuung zeigten im Vergleich zur Population der CD4-T-Zellen ($P < 0,001$; Streuung $0-218 \text{ IFN}\gamma^+/10^4$ CD8-T-Zellen gegenüber $0-12,2 \text{ IFN}\gamma^+/10^4$ CD4-T-Zellen, Abbildung 15). Alloreaktivität kann unabhängig in jeder der beiden T-Zell-Populationen vorkommen. Während 62 Probanden (48,4%) in keiner der beiden Populationen detektierbare alloreaktive T-Zellen aufwiesen, zeigten 20 Probanden (15,7%) ausschließlich alloreaktive CD4- und 30 Probanden (23,4%) ausschließlich alloreaktive CD8-T-Zellen. Bei 16 Probanden (12,5%) waren sowohl alloreaktive CD4- als auch CD8-T-Zellen gleichzeitig nachweisbar

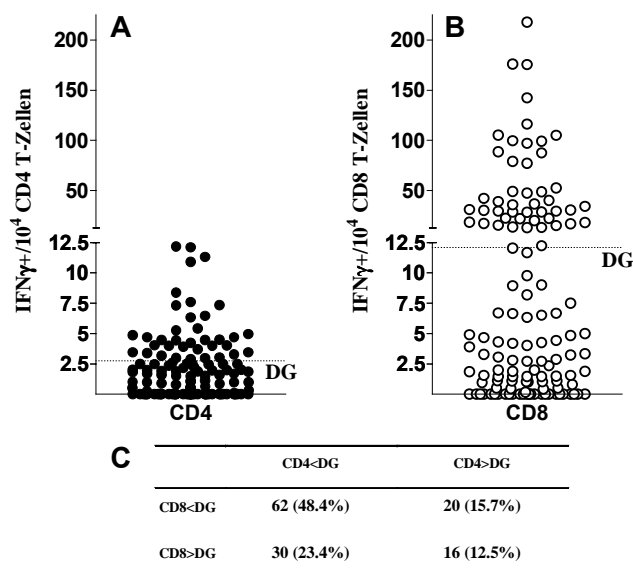


Abbildung 15. Hohe Frequenzen alloreaktiver T-Zellen finden sich überwiegend in der Subpopulation der CD8-T-Zellen. Es wurden 128 unterschiedliche Kombinationen aus 41 Probanden auf das Vorhandensein alloreaktiver CD4- und CD8-T-Zellen (A bzw. B) untersucht. „DG“ bezeichnet die jeweilige Detektionsgrenze für alloreaktive CD4- bzw. CD8-T-Zellen (2,76 IFN γ ⁺/10⁴ CD4-T-Zellen bzw. 12,1 IFN γ ⁺/10⁴ CD8-T-Zellen). (C) Verteilung der alloreaktiven CD4- und CD8-T-Zellen in den getesteten Kombinationen.

(Abb. 15C; $p=0,22$; Fisher's exakter Test). Diese Daten zeigen, daß präformierte alloreaktive T-Zellen in ungefähr 50% aller getesteten Kombinationen nachgewiesen werden können. Die Frequenzen alloreaktiver CD8-T-Zellen liegen höher als diejenigen der CD4-T-Zellen und können einen Anteil von bis zu 2% der gesamten CD8-T-Zellpopulation ausmachen.

4.11 Die Anzahl der HLA-Mismatches kann keine Aussage über die direkte Alloreaktivität im Einzelfall treffen

Es hat sich gezeigt, daß das HLA-Matching bei der Organallokation die Häufigkeit akuter Abstoßungen reduziert und das Transplantatüberleben verlängern hilft, jedoch kann damit keine Aussage über die Transplantatverträglichkeit im individuellen Fall getroffen werden (OPELZ, 1991). Um die Korrelation zwischen HLA-Übereinstimmung und der Frequenz detektierbarer alloreaktiver T-Zellen zu analysieren, wurden 106 unabhängige Paar-Kombinationen aus 41 Probanden mit bekanntem MHC-Klasse-I-Typ getestet. Entsprechend dem dokumentierten klinischen Nutzen des HLA-Matching fand sich eine Korrelation zwischen der Anzahl der MHC-Klasse-I-Mismatches und dem Anteil an Probanden mit messbaren alloreaktiven CD8-T-Zellen (χ^2 test, $p=0,027$; Abb. 16). Vier bzw. drei Mismatches waren assoziiert mit direkter CD8-Alloreaktivität in 36 bzw. 39% der Probanden, während dieser Anteil bei Kombinationen mit nur zwei Mismatches auf 14% zurückging. In den Gruppen mit nur einem oder gar keinem Mismatch war in den untersuchten Kombinationen keine Alloreaktivität nachweisbar, wobei hier jedoch nur 8 Kombinationen in diesen Gruppen zur Analyse zur Verfügung standen.

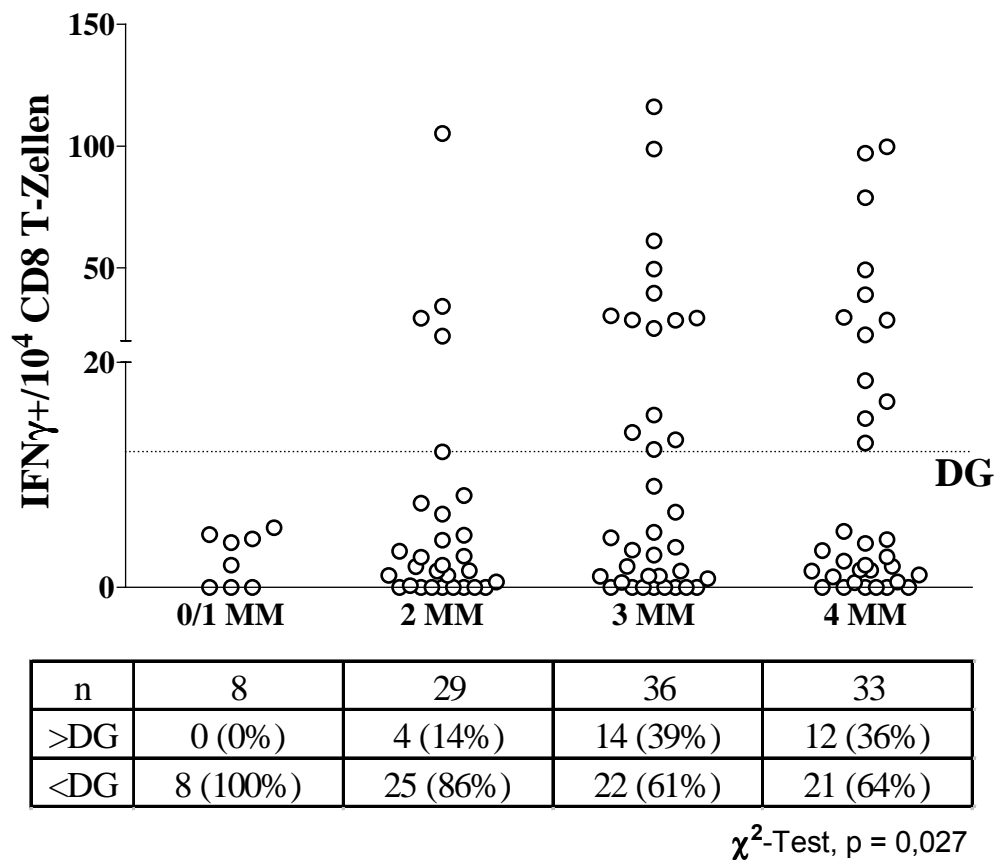


Abbildung 16. Korrelation zwischen der Zahl der HLA-Mismatches und der Frequenz alloreaktiver CD8-T-Zellen. In 106 unterschiedlichen Kombinationen aus 42 Probanden wurden die Frequenzen alloreaktiver CD8-T-Zellen analysiert und nach der Anzahl der entsprechenden MHC-Klasse-I-Mismatches (MM) aufgeschlüsselt. Zwei Paare ohne Mismatches wurden hier mit sechs Paaren mit einem Mismatch zusammengefaßt. Die Tabelle zeigt für jede dargestellte Gruppe die Gesamtzahl getesteter Probanden sowie die Anzahl und den Prozentsatz derjenigen Probanden mit CD8-T-Zellfrequenzen oberhalb und unterhalb der Detektionsgrenze (DG) für Alloreaktivität. Die Verteilung der Mismatches und der Prozentsatz alloreaktiver Probanden unterschied sich nicht zwischen gesunden Kontrollpersonen (42 Paare) und Transplantatempfängern (64 Paare), Daten nicht gezeigt.

Weiterhin wurden 70 Kombinationen aus 30 Probanden mit bekanntem MHC-Klasse-II-Typ untersucht. Erwartungsgemäß fand sich hier keine Korrelation zwischen der Anzahl der MHC-Klasse-II-Mismatches und der CD8-Alloreaktivität ($p=0,76$; Daten nicht gezeigt).

Bemerkenswert ist, daß die Bandbreite der gemessenen Frequenzen alloreaktiver CD8-T-Zellen in den Gruppen mit 2, 3 bzw. 4 Mismatches recht ähnlich ausfiel (0-105,1 bzw. 0-116,0 bzw. 0-99,6 $\text{IFN}\gamma^+ / 10^4$ CD8-T-Zellen). Während also zwar eine Korrelation besteht zwischen der HLA-Klasse-I-Übereinstimmung und Alloreaktivität auf Populationsbasis, verdeutlicht die weite Überlappung der Frequenzen alloreaktiver T-Zellen zwischen den Mismatch-Gruppen den eingeschränkten Nutzen der HLA-Typisierung zur Vorhersage des alloreaktiven Potentials im Einzelfall.

5 Diskussion

Die Immunsuppression ist als entscheidendes Moment der Prävention und Therapie von Transplantatrejektionen in der Transplantationsmedizin bisher unverzichtbar. Die potenten Immunsuppressiva Cyclosporin A und FK506 (Tacrolimus) spielen hierbei eine wesentliche Rolle und gehören zur Standardmedikation nach Nierentransplantation. Alle bisher klinisch eingesetzten Immunsuppressiva teilen jedoch den gravierenden Nachteil, daß sie nicht selektiv Alloreaktivität unterdrücken, sondern das gesamte adaptive Immunsystem supprimieren. Immunsuppressiva besitzen eine geringe therapeutische Breite, und sowohl eine Unter- wie auch eine Überdosierung birgt Gefahren für den Patienten. Während eine Unterimmunsuppression eine Transplantatabstoßung und potentiell einen Transplantatverlust nach sich ziehen kann, erhöht eine Überimmunsuppression die Gefahr folgenschwerer infektiöser Komplikationen und steigert längerfristig das Neoplasierisiko (PENN, 2000). Auf Grund dieser weitreichenden Konsequenzen ist eine exakte und engmaschige klinische und laboranalytische Überwachung der verabreichten Immunsuppression von entscheidender Bedeutung. Im Falle der Calcineurin-Inhibitoren Cyclosporin A und FK506 bedient man sich als Parameter bei der Kontrolle der Immunsuppression neben klinischen und histologischen Parametern vor allem der Spiegelbestimmung dieser Substanzen aus dem Vollblut der Patienten. Die Zielwerte dieses Parameters sind empirisch gewonnen und repräsentieren diejenigen Spiegel, für die eine Über- und Unterimmunsuppression im Durchschnitt durch ein großes Patientenkollektiv am besten vermieden wird. Da der Vollblutspiegel jedoch kein funktioneller Parameter für die Wirkstärke der Substanz ist, läßt er im individuellen Fall lediglich eine Schätzung der tatsächlichen Wirkstärke zu. Das klinische Ansprechen auf Calcineurin-Inhibitoren, sowohl hinsichtlich Effektivität als auch hinsichtlich Immunsuppressiva-Toxizität, kann selbst zwischen Patienten mit ähnlichen Vollblutspiegeln beträchtlich schwanken (TSUNODA, AWEEKKA, 1996). Auch die Beobachtung einer interindividuell unterschiedlichen Suszeptibilität für die Hemmung der Zytokininduktion durch Calcineurin-Inhibitoren ist in der Literatur dokumentiert und verdeutlicht die Notwendigkeit einer funktionellen Analyse der Wirkstärke dieser Substanzen (VAN DEN BERG et al., 1998a; VAN DEN BERG et al., 1998b; AHMED et al., 2001).

Im ersten Teil dieser Arbeit wurde ein durchflußzytometrischer Kurzzeitassay zur Quantifizierung der Wirkstärke von Cyclosporin A und FK506 basierend auf deren Hemmung der Induktion von IFN γ und IL-2 in T-Zellen beschrieben. IL-2 wurde ausgewählt, da es eine wichtige Rolle in der Aktivierung von T-Zellen spielt und das IL-2-Gen als Zielgen für die Wirkung der Calcineurin-Inhibitoren beschrieben ist (HO et al., 1996; HALLORAN, 2004). IFN γ wurde gewählt, da es zum einen als wichtiger Aktivator von Makrophagen und zytotoxischen Lymphozyten fungiert und zum anderen in Tiermodellen wie auch beim Menschen mit der Allotransplantatabstoßung in Verbindung gebracht wird (DALLMAN, 1995; MATESIC et al., 1998; HEEGER et al., 1999; NAJAFIAN et al., 2002). Es ist beschrieben, daß der IFN γ -Promoter mindestens ein Ca²⁺-induzierbares, CsA-sensitives Element besitzt,

das eine potentielle NFAT-Bindungsstelle ist (CAMPBELL et al., 1996). Nach lediglich sechsstündiger Stimulation, die antigenspezifisch wie auch mittels Superantigen erfolgen kann, ließ sich eine deutliche dosisabhängige Inhibition der IFN γ - und IL-2-Induktion auf Einzelzellniveau in T-Zellen nachweisen und reproduzierbar (VAN BENTUM, 2005) quantifizieren. In der Literatur finden sich verschiedene methodische Ansätze anderer Arbeitsgruppen zur Quantifizierung der Wirkung von Calcineurin-Inhibitoren, wobei als Assays vor allem ELISA-Techniken und in letzter Zeit zunehmend auch durchflußzytometrische Verfahren zum Einsatz kommen (VAN DEN BERG et al., 1998a; VAN DEN BERG et al., 1998b; ROSTAING et al., 1999; STEIN et al., 1999; AHMED et al., 2001). Insbesondere der hemmende Effekt der Calcineurin-Inhibitoren auf die IL-2-Induzierbarkeit oder die IL-2-abhängige Lymphozytenproliferation wurde als Ausleseparameter vielfach genutzt. So untersuchen Studien den Einfluß von Serum immunsupprimierter Patienten auf die Proliferation von Lymphozyten gesunder Kontrollprobanden oder analysieren isolierte Lymphozyten immunsupprimierter Patienten auf deren Fähigkeit in Kultur zu proliferieren oder IL-2 zu produzieren. Abgesehen davon, daß Kulturzeiten von mehreren Tagen einen Assay unpraktikabel machen für Analysen in klinischem Rahmen, spielt gerade bei den Calcineurin-Inhibitoren die Frage des Mediums eine entscheidende Rolle. Im Gegensatz zu anderen Arbeitsgruppen, die mit verdünntem Vollblut oder isolierten PBMC arbeiten (VAN DEN BERG et al., 1998a; VAN DEN BERG et al., 1998b; ROSTAING et al., 1999), setzten wir unverdünntes Vollblut ein. Cyclosporin A und FK506 sind Substanzen mit komplexer Biodistribution. Bei physiologischen Temperaturen liegen nur ungefähr 4% des Cyclosporin A in freier Form vor, während der größte Teil in Erythrozyten oder an Plasmaproteine gebunden vorliegt (LEMAIRE, TILLEMENT, 1982). Auch die Verteilung von FK506 ist abhängig von Substanzkonzentration, Temperatur, Hämatokrit- und Plasmaproteinkonzentration, wobei im Vollblut mehr als 95% der Substanz in Erythrozyten vorliegt und im Plasma mehr als 98,8% der Substanz an Plasmaproteine wie Lipoproteine, Globuline und Albumin gebunden ist (NAGASE et al., 1994). Diese Faktoren sind daher mitbestimmend für die Menge an freier Substanz und damit letztlich auch für den immunsuppressiven Effekt. Ihr Einfluß wird jedoch durch die Höhe des Vollblutspiegels nicht reflektiert. Weiterhin ist für Cyclosporin A beschrieben, daß die Substanz nach Zellisolierung und Inkubation in Kulturmedium zügig über aktive Transportmechanismen aus dem Zytoplasma eliminiert wird (BATIUK et al., 1995), wodurch auch die inhibitorischen Effekte auf die T-Zellaktivierung unter solchen Bedingungen zügig verlorengehen. In Vollblutansätzen hingegen liegt durch die exzessive Erythrozyten- und Plasmaproteinbindung ein großer Puffer vor, der einen Abfall der zytoplasmatischen Substanzkonzentration verhindern hilft (LEMAIRE, TILLEMENT, 1982). So können die *in vivo* Verhältnisse in das Assaysystem übertragen werden. Wenn es also um eine möglichst valide *in vitro* oder *ex vivo* Abbildung geht, bieten Vollblutassays in dieser Hinsicht klare Vorteile gegenüber Ansätzen mit isolierten Zellen. Verglichen mit Methoden wie der Zytokinmessung in Zellkulturüberständen bietet das durchflußzytometrische Verfahren darüber hinaus die einfache Möglichkeit zur gleichzeitigen Anfärbung und Analyse mehrerer

Zytokine, inklusive der Quantifizierung der Zytokinproduktion auf Einzelzellniveau, oder zusätzlicher Oberflächenantigene (Aktivierungsmarker, Reifegrad-Marker, Markierung von Zell-Subpopulationen) und damit einer weitergehenden phänotypischen und funktionellen Charakterisierung. Durch leichte Abwandlung des Assays, wie unter 4.5.2 beschrieben, ist außerdem eine weitere funktionelle Charakterisierung in Form einer Zytotoxizitätsmessung möglich. Die publizierten Analysen der Calcineurin-Inhibitor-Wirkung auf stimulierte Zytokinantworten basieren meist auf Stimulationen mit Phytohämagglutinin oder Phorbol-12-Myristat-13-Acetat + Ionomycin (VAN DEN BERG et al., 1998a; VAN DEN BERG et al., 1998b; ROSTAING et al., 1999; STEIN et al., 1999; AHMED et al., 2001). Hierdurch lassen sich, ähnlich der in dieser Arbeit verwandten SEB-Stimulation, hohe Frequenzen reaktiver T-Zellen erzeugen. Durch die zusätzliche Optimierung unserer Methode für virusspezifische (CMV-Antigen) Stimulation lassen sich jedoch darüber hinaus Rückschlüsse auf die Wirkung der Calcineurin-Inhibitoren nach physiologischer T-Zell-Stimulation ableiten. Betrachtet man die Dosis-Wirkungs-Kurven der beiden Substanzen (Abbildung 11), so fällt auf, daß diese Kurven für CMV-Ag- und SEB-stimierte Zellen nicht durchweg deckungsgleich verlaufen. Im Falle der CD4-T-Zellen läuft die Inhibition durch Cyclosporin A zwar unabhängig von der Stimulationsart über weite Strecken parallel. Für FK506 erkennt man jedoch, daß die Inhibition SEB-stimulierter Zellen bei gleicher Konzentration stärker ausfällt als bei virusspezifisch stimulierten Zellen. Dies mag Ausdruck eines differentiellen Wirkprofils der beiden Substanzen sein, das durchaus von klinischer Relevanz sein könnte. Für CD8-T-Zellen deutet sich dieser Unterschied ebenfalls an in der Form, daß hier die durch Cyclosporin A vermittelte Inhibition der zytotoxischen T-Zellen nach CMV-Ag-Stimulation früher einsetzte als nach SEB-Stimulation. Dennoch sei darauf hingewiesen, daß das von uns verwandte CMV-Komplettantigen für die Stimulation von CD4-Zellen deutlich klarere Ergebnisse lieferte als für die CD8-Stimulation. Auf Grund der gegenüber einer Peptidstimulation ineffektiveren Einschleusung des Antigens in den MHC-Klasse-I-Weg bezieht sich diese Diskussion daher in erster Linie auf die eindeutigen Ergebnisse bei CD4-T-Zellen. Wir verwandten die CMV-Ag-Stimulation als Beispiel für eine hochspezifische Stimulation, die eine IFN γ -Induktion hervorbringt, bei der sich die Population der spezifisch positiven T-Zellen scharf von der zytokinnegativen Zellen abgrenzt. Die Stimulation mittels Superantigen hingegen ist keine hochspezifische. Superantigene können viele T-Zellrezeptoren direkt binden. Die bakteriellen Superantigene greifen vornehmlich an der CDR2-Schleife der V β -Kette des T-Zellrezeptors, in geringerem Maße an der V β -CDR1-Schleife sowie an der hypervariable Schleife 4 (HV4-Schleife) an und können somit bis zu 20% der T-Zellen eines Menschen direkt binden (FLEISCHER, 1994). Es ist naheliegend, daß die Bindungen an die verschiedenen V β -Ketten mit unterschiedlicher Spezifität erfolgen und unterschiedlich starke T-Zellaktivierungen nach sich ziehen. Entsprechend beobachteten wir nach SEB-Stimulation ein Expressionsmuster, bei dem sich die IFN γ -Induktion in den aktivierten T-Zellen im Vergleich zur virusspezifischen Aktivierung über einen deutlich weiteren Bereich erstreckte mit teils sehr stark und teils nur schwach reagierenden T-Zellen.

In dieser Hinsicht ähnelte das IFN γ -Expressionsmuster nach Superantigenstimulation dem Bild, wie wir es nach allogener Stimulation sahen. Auch die direkte Erkennung von Fremd-MHC durch T-Zellen kann polyklonal sein, wird in der Regel weniger stark ausfallen als eine hochspezifische T-Zellaktivierung und im Falle einer polyklonal zusammengesetzten Reaktion unterschiedlich starke Aktivierungen zur Folge haben. Aus diesen Überlegungen heraus mag die Superantigenstimulation in gewisser Weise als Modell einer allogenen Stimulation dienen. Unter diesem Aspekt hätten die oben geschilderten Unterschiede in den Dosis-Wirkungs-Kurven der beiden Substanzen womöglich interessante klinische Implikationen, könnte es doch bedeuten, daß Tacrolimus gegenüber Cyclosporin A möglicherweise bevorzugt auf allogen aktivierte T-Zellen wirkt und hochspezifische Aktivierungen, wie beispielsweise durch CMV-Ag, weniger stark inhibiert. Ein solches differentiell wirkendes Profil wäre klinisch von besonderer Bedeutung, da es im Interesse des Klinikern liegt, nach Transplantation möglichst selektiv die Alloreaktivität zu unterbinden bei gleichzeitig erhaltener Immunität gegen Pathogene. Diese Überlegungen hinsichtlich des Wirkprofils von CsA und FK506 werden gestützt durch die klinische Beobachtung, daß unter FK506-basierten immunsuppressiven Regimen die Zahl akuter Abstoßungen niedriger ausfällt als unter CsA-basierten Regimen (MAYER et al., 1997; PIRSCH et al., 1997), ohne jedoch mit einer erhöhten Inzidenz infektiöser Komplikationen einherzugehen.

Die vorgestellte Methode eröffnet die Option der zeitnahen Überwachung der virusspezifischen Immunantwort eines Patienten unter Immunsuppression, was im Falle persistierender viraler Infektionen nach Transplantation von Interesse ist. Auch wäre eine Analyse vor Transplantation denkbar zur Bestimmung, welchen Einfluß ein angestrebter Immunsuppressivumspiegel auf die CMV-spezifische Immunantwort eines CMV-positiven Patienten haben wird. In unserer Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, daß die Frequenz CMV-spezifischer CD4-T-Zellen im Falle ihres Absinkens unter einen bestimmten Grenzwert ein früher Marker für das Auftreten CMV-spezifischer Komplikationen ist (SESTER et al., 2001). Mit der hier vorgestellten Methode läßt sich ein solcher Immunsuppressiva-induzierter Rückgang der CMV-spezifischen CD4-T-Zellen unter einen kritischen Grenzwert frühzeitig erkennen, so daß unter Umständen entsprechende präventive Maßnahmen, in diesem Falle beispielsweise eine präemptive antivirale Behandlung, eingeleitet werden können. Die hier beschriebene Methode erlaubt über die Einstellung beliebiger Vollblutspiegel von Cyclosporin A und FK506 *in vitro* die Anfertigung einer individuellen Dosis-Wirkungs-Kurve für einen Probanden und somit möglicherweise einen Weg, die benötigte Konzentration des Immunsuppressivums anhand der angestrebten T-zellulären Inhibition zu bestimmen. Eine Ausweitung dieser Methode auf die Analyse auch anderer Immunsuppressiva und sogar Immunsuppressiva-Kombinationen wurde in unserer Arbeitsgruppe bereits erfolgreich durchgeführt (VAN BENTUM, 2005). Stein et al. stellten vor einiger Zeit eine einfache und zügige Methode zur Bestimmung des Cyclosporineffektes vor, die sich der Analyse der stimulierten IL-2-Induktion aus Vollblut mittels ELISA bedient (STEIN et al., 1999). Es wurde Blut von Patienten unter Cyclosporin A Medikation im Tagesverlauf *ex vivo* analysiert und

parallel aus den Talspiegel-Blutproben derselben Patienten *in vitro* Dosis-Wirkungs-Kurven erstellt. Hierbei zeigte sich eine sehr gute Übereinstimmung zwischen den *ex vivo* analysierten Cyclosporin A Effekten und der *in vitro* vorhergesagten Wirkung, was die klinische Relevanz von Vollblutmethoden unterstreicht. Zum Einsatz im klinischen Rahmen ist bei der in dieser Arbeit vorgestellten Methode das IFN γ dem IL-2 als Indikatorzytokin vorzuziehen, da zum einen IL-2 in CD8-T-Zellen selbst nach SEB-Stimulation nur verhältnismäßig schwach exprimiert wird (und nach CMV-Ag-Stimulation gar nicht) und zum anderen das IFN γ -Expressionsmuster der Zellen im Dotplot eine leichtere Abgrenzung der spezifisch positiven gegen die IFN γ -negativen Zellen erlaubt, als dies bei IL-2 der Fall ist. Dies erhöht die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse deutlich und macht die Messungen verschiedener Untersucher somit besser untereinander vergleichbar. Bei jedem Versuch der Abbildung von *in vivo* Verhältnissen in einem Testsystem sind Einschränkungen unumgänglich. Zwar konnten wir zeigen, daß die Wirkung der Calcineurin-Inhibitoren auf den Ausleseparameter IFN γ sich analog der Wirkung auf die IL-2-Induzierbarkeit und auch auf die T-zellvermittelte Zielzell-Lyse als weitere Effektorfunktion der T-Zellen verhält. Dennoch ist dies nur ein Ausschnitt der Effekte der beiden Substanzen. Es sind weitere Studien notwendig zur Klärung der Frage, ob die Messung der Wirkung von Cyclosporin A und FK506 auf die IFN γ -Induzierbarkeit in T-Zellen bzw. T-Zell-Subpopulationen ein Parameter ist, der besser mit klinisch bedeutsamen Ereignissen korreliert als bisherige pharmakodynamische oder pharmakokinetische Parameter.

Im Falle der Organtransplantation wäre es zum Zwecke der individualisierten Therapie zudem von entscheidender Bedeutung, das alloreaktive Potential einer gegebenen Spender-Empfänger-Konstellation möglichst noch vor der Transplantation einschätzen zu können. Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde ein durchflußzytometrischer Kurzzeit-Assay etabliert und charakterisiert, der eine Quantifizierung direkt alloreaktiver T-Zellen nach einer lediglich sechsstündigen Stimulation erlaubt. Die funktionelle Charakterisierung sowohl von CD4- als auch von CD8-T-Zellen erfolgte hierbei über die Induktion von Zytokinen nach Stimulation mit Spender-PBMC. Als Indikator-Zytokin diente IFN γ , da es als Aktivator von Makrophagen und zytotoxischen T-Zellen fungiert und in Tiermodellen wie auch beim Menschen mit der Allotransplantatabstoßung in Verbindung gebracht wird (DALLMAN, 1995; MATESIC et al., 1998; HEEGER et al., 1999; NAJAFIAN et al., 2002). Die Differenzierung von Spender- und Empfängerzellen erfolgte über eine einfache Vorfärbung der Spender-PBMC mit einem FITC-konjugierten monoklonalen Antikörper gegen den Pan-Leukozyten-Marker CD45. Dies erlaubte eine saubere Trennung der Spender- und Empfängerpopulation, ohne die T-Zell-Reaktivität zu beeinflussen, wodurch aufwendige Prozeduren wie Bestrahlung, Mitomycin-C-Behandlung oder T-Zelldepletion ersetzt wurden. Hinzu kommt, daß die Methode der α CD45-Vorfärbung der Spender-PBMC neben der Quantifizierung der Alloreaktivität auf Empfängerseite gleichzeitig auch die Identifikation alloreaktiver T-Zellen auf Seiten der Spender-T-Zellen erlaubte, ohne daß es zu gegenseitiger Beeinflussung durch Bystander-Effekte kam. Obwohl dies in der Transplantation solider Organe keine Rolle spielt, könnte die

gleichzeitige Analyse von Graft-versus-Host- sowie Host-versus-Graft-Reaktion durchaus im Rahmen von Stammzelltransplantationen Bedeutung erlangen. Da vorgefärbte PBMC sich ohne Verlust ihrer stimulatorischen Kapazität über mehrere Monate kältekonservieren lassen (Daten nicht gezeigt), könnten serielle Analysen alloreaktiver T-Zellen im Verlaufe nach Transplantation mit zuvor tiefgefrorenen, vorgefärbten Spender-PBMC ermöglicht werden. Darüber hinaus konnten wir zuvor für Recall-Antigen zeigen, daß die Resultate der durchflußzytometrischen Analyse nicht durch Immunsuppressiva-Talspiegel beeinflusst werden (SESTER et al., 2001; SESTER et al., 2002a; SESTER et al., 2002b; SESTER et al., 2003; SESTER et al., 2004a).

Der in dieser Arbeit vorgestellte durchflußzytometrische Ansatz wurde mit der "enzyme-linked immunosorbent spot" (ELISPOT) Methode verglichen (SESTER et al., 2004b), einem etablierten Test zur Quantifizierung allospezifischer T-Zellen. Eine Serie mit 35 unabhängigen Paar-Kombinationen zeigte, daß die durchflußzytometrisch erhobene Frequenz alloreaktiver CD3-T-Zellen signifikant mit der Zahl der spot-forming units im ELISPOT-Assay korrelierte ($r=0,42$; $p=0,01$). Der beobachtete absolute Unterschied der ermittelten Frequenzen zwischen ELISPOT und Durchflußzytometrie ($0,5\pm 3,6$ spots bzw. $11,6\pm 6,8$ events pro 10.000 T-Zellen) deckt sich mit den Beobachtungen bei vergleichenden Messungen virusspezifischer T-Zellen (KARLSSON et al., 2003).

Die klinische Anwendbarkeit des vorgestellten Assays wurde bereits in einer Pilotstudie an sieben Empfängern von Nieren-Lebendspenden getestet. In Übereinstimmung mit vorhergehenden Studien, die sich der aufwendigen Limiting-dilution-Technik bedienten (HERZOG et al., 1987; MESTRE et al., 1996; DE HAAN et al., 2001), konnte mit unserem Kurzzeit-Assay ein signifikanter Rückgang der Frequenz direkt alloreaktiver CD8-T-Zellen im peripheren Blut innerhalb weniger Tage nach Transplantation bestätigt werden (SESTER et al., 2004b). Dieser zügige Rückgang deutet auf ein Abwandern der alloreaktiven T-Zellen in das Transplantat hin, da die gemessenen T-Zell-Antworten gegen CMV-Antigen oder gegen PBMC, die nicht vom Organspender stammten, auch in der Folge nach Transplantation nachweisbar blieben. Diese These wird gestützt durch Untersuchungen nach Herztransplantation, in denen die Frequenz Allopeptid-reaktiver T-Zellen im Transplantat zehn- bis fünfzigmal höher lag als im zirkulierenden Blut (LIU et al., 1996). Eine Reduktion der detektierbaren Alloreaktivität durch selektive Hyporeaktivität der alloreaktiven T-Zellen wäre ein anderer denkbarer Mechanismus, der dieser Beobachtung zugrunde liegen könnte (NG et al., 2002).

Es ist bemerkenswert, daß sich das Muster präformierter Alloreaktivität zwischen CD4- und CD8-T-Zellen unterscheidet. In der von uns getesteten Gruppe von 128 Spender-Empfänger-Kombinationen wiesen 23,4% der Probanden meßbare Alloreaktivität nur in der Population der CD8-T-Zellen auf, 15,7% lediglich in der Population der CD4-T-Zellen und 12,5% in beiden Subpopulationen gleichzeitig. Außerdem lagen die gemessenen Frequenzen

alloreaktiver T-Zellen in der CD8-Population signifikant höher als bei den CD4-T-Zellen. Dieser letztgenannte Punkt könnte Ausdruck der unterschiedlichen Funktion der beiden T-Zell-Populationen sein: CD4-T-Zellen stimulieren B-Lymphozyten zur Proliferation und Produktion von Alloantikörpern und können außerdem Hilfssignale zur Induktion von zytotoxischen T-Lymphozyten beisteuern (KRIEGER et al., 1996). CD8-positive zytotoxische T-Zellen hingegen vermitteln direkt vor Ort die Lyse allogener Zielzellen, so daß für eine, aus immunologischer Sicht, erfolgreiche Abwehr bereits initial möglichst hohe Frequenzen dieser zytotoxischen Effektorzellen benötigt werden. Wahrscheinlicher jedoch spricht diese Beobachtung möglicherweise für eine höhere Neigung des T-Zell-Rezeptors auf CD8-Zellen zur Kreuzreaktivität verglichen mit demjenigen auf CD4-T-Zellen. Dies könnte wiederum mit der Größe der Peptide zusammenhängen, die in den beiden Klassen von MHC-Molekülen präsentiert werden. MHC-I-bindende Peptide sind gewöhnlich 8 bis 10 Aminosäuren lang. Demgegenüber sind Peptide, die in MHC-II gebunden werden, mindestens 13 Aminosäuren lang, können aber durchaus auch deutlich länger sein. Denn im Gegensatz zur Peptid:MHC-I-Bindung, bei der der Kontakt zwischen Gruppen konservierter Aminosäuren im MHC-I-Molekül und dem freien Amino- und Carboxylende des Peptids wesentlich zur stabilen Bindung beiträgt, werden vom MHC-II-Molekül die Peptidenden nicht gebunden. Das Peptid liegt ausgestreckt längs der MHC-Bindungsfurche und kann an beiden Enden herausragen, wobei längere Peptide allerdings meist durch Peptidasen auf eine Länge zwischen 13 und 17 Aminosäuren gekürzt werden. Man könnte somit schlußfolgern, daß MHC-II-bindende Peptide auf Grund ihrer Länge vielfältiger und in ihrer antigenen Struktur einzigartiger sind als MHC-I-bindende Peptide, was die Wahrscheinlichkeit für Kreuzreaktionen verringert.

CD4- und CD8-T-Zellen regulieren nach direkter Alloantigen-Erkennung die Oberflächen-Expression des Lymphknoten-Homing-Rezeptors CD62L herab, regulieren die Expression des Aktivierungs-/Adhäsionsmoleküls CD44 herauf, verlassen die sekundären lymphatischen Gewebe und zirkulieren in der Peripherie, wo sie dann im Transplantat erneut auf ihr spezifisches Antigen treffen können (DUTTON et al., 1998). Nicht nur CD8-positive zytotoxische T-Zellen, sondern auch CD4-T-Zellen, die direkt Donor-Antigen auf Donor-Zellen erkennen, können eine akute Transplantatabstoßung vermitteln (PIETRA et al., 2000). Man darf postulieren, daß das Abwandern von T-Zellen in das transplantierte Organ am Prozeß der Allotransplantatabstoßung beteiligt ist. Grundsätzlich ist es vorstellbar, daß CD4- und CD8-T-Zellen unterschiedlichen Anteil hinsichtlich Kinetik oder Art der Abstoßungsreaktion nehmen. Wir demonstrierten in dieser Arbeit, daß präformierte Alloreaktivität unabhängig in den beiden T-Zellpopulationen (CD4 und CD8) auftritt. Die hier vorgestellte Methode erscheint somit als nützliches Hilfsmittel für prospektive Studien zur Klärung, in welcher Form und in welchem Ausmaß präformierte direkte Alloreaktivität in den beiden T-Zell-Subgruppen jeweils zur Entwicklung von Abstoßungsreaktionen beiträgt. Eine Vielzahl experimenteller Ansätze, wie beispielsweise Mixed lymphocyte culture, Limiting dilution assay oder die Lyse allogener Ziel-Zellen sind wertvolle Hilfsmittel gewesen, um molekulare Mechanismen im Prozeß der Allotransplantatabstoßung aufzudecken, sowohl in Tiermodellen, als auch im

Bereich der humanen Organtransplantation. Deren Einsatz in der klinischen Routinediagnostik war jedoch meist nicht sinnvoll durchführbar, da die meisten Methoden zur Messung direkter Alloreaktivität ausgesprochen lange Inkubationszeiten benötigen, zeitaufwendige und arbeitsintensive Zellpräparationen voraussetzen oder nicht in der Lage sind, zwischen den T-Zell-Subgruppen zu differenzieren. Experimentelle Ansätze, die sich der Analyse von Zytokin-mRNA im Transplantat (DALLMAN et al., 1992; SUTHANTHIRAN, 1997) oder von Zytokinsekretion in den Kulturüberstand (CHUNG et al., 1998) bedienen, sind zwar in der Regel weniger arbeitsintensiv, besitzen jedoch eine eingeschränkte Spezifität auf Grund unspezifischer Bystander-Aktivierung. In letzter Zeit sind durchflußzytometrische Assays publiziert worden, die eine Quantifizierung alloreaktiver T-Zellen nach 24- bis 48-stündiger Stimulation mit isolierten Monozyten, EBV-transformierten, lymphoblastoiden Zelllinien oder bestrahlten und T-zelldepletierten Milzzellen erlauben (PAGLIERONI et al., 1999; DE HAAN et al., 2002). Auch wurde vor einiger Zeit mittels ELISPOT-Assay eine Quantifizierung direkt alloreaktiver T-Zellen vor Transplantation durchgeführt (HEEGER et al., 1999; NAJAFIAN et al., 2002). Mit diesem Ansatz konnte eine signifikante Korrelation zwischen der vor Transplantation bestimmten Frequenz spezifisch IFN γ -positiver T-Lymphozyten und dem Auftreten von Abstoßungsreaktionen nach Transplantation demonstriert werden. Die gleiche Arbeitsgruppe räumte allerdings vor einiger Zeit den gewichtigen Nachteil ihres Ansatzes ein, daß die Vorbehandlung der Stimulatorzellen mit Mitomycin C oder Bestrahlung diese Zellen nicht daran hinderte, beträchtliche Mengen an IFN γ zu sezernieren. Diese unspezifische Verfälschung des Meßergebnisses ließ sich nur durch zusätzliche T-Zelldepletierung der Stimulatorzellen verhindern (GEBAUER et al., 2002). Ein alternativer Ansatz verwendet synthetische Peptide aus donorspezifischen HLA-DR-Molekülen zur Stimulation alloreaktiver T-Zellen. Dies scheint eine äußerst sensitive und spezifische Methode zur Analyse indirekter Alloreaktivität zu sein, und es konnte gezeigt werden, daß indirekte Alloreaktivität gegen donorspezifische HLA-DR-Peptide bei Patienten mit chronischer Transplantatdysfunktion häufiger zu finden ist als bei Patienten mit stabiler Transplantatfunktion (NAJAFIAN et al., 2002). Obwohl diese Methode interessant ist für die Analyse indirekter Alloreaktivität, die sich nach Transplantation entwickelt, leistet sie keinen Beitrag zur Identifikation präformierter direkter Alloreaktivität vor Transplantation. Dennoch könnte dieser Ansatz trotz seiner Beschränkung auf einzelne immundominante Peptide in prospektiven Studien zur Überwachung des Auftretens indirekter Alloreaktivität nach Transplantation dienen. Sämtliche genannten Methoden haben in der Vergangenheit die Bedeutung alloreaktiver T-Zellen für Transplantatakzeptanz und Transplantatprognose unterstrichen. Die Nachteile des großen Zeit- und Arbeitsaufwandes und der Beeinflussung durch unspezifische Bystander-Aktivierung, die unter bisherigen Assays zur Beurteilung von Alloreaktivität gängig sind, wurden in der vorliegenden Arbeit durch Optimierung der Stimulationsbedingungen und durch Minimierung der Inkubationszeit überwunden. Wir konnten zeigen, daß alloreaktive T-Zellen sich durch den Einsatz verbesserter Stimulationsbedingungen, beispielsweise die Verwendung von Polypropylen-

Rundbodenröhrchen, wiederholte Resuspendierungs- und Zentrifugationsschritte und die Zugabe kostimulatorischer Antikörper, bereits nach nur sechsstündiger Stimulation quantifizieren lassen. Hinzu kommt, daß außer der Vorfärbung keine zusätzliche, aufwendige Behandlung der Stimulatorzellen notwendig ist. Auch kam es nicht zur Beeinflussung der Meßergebnisse durch antigen-unspezifische Bystander-Aktivierung. Über die reine Quantifizierung der alloreaktiven T-Zellen hinaus können mit diesem Ansatz weitere Zytokine und auch Oberflächenmarker (beispielsweise CD25, CD45R0, etc.) analysiert werden, was eine detailliertere Charakterisierung der reaktiven T-Zellpopulation hinsichtlich Differenzierungsgrad und Zytokinprofil erlaubt.

Die Bestimmung alloreaktiver T-Zellen könnte helfen, Patienten zu identifizieren, die ein erhöhtes Risiko aufweisen, nach Transplantation eine Abstoßung zu entwickeln. Gegenwärtig erfolgt die Zuteilung von Nierentransplantaten unter Berücksichtigung der Ergebnisse der HLA-Typisierung von Spender und Empfänger, da Organempfänger mit guter HLA-Übereinstimmung ein bedeutend längeres Transplantat- und Patientenüberleben aufweisen im Vergleich zu Patienten, die mit mehreren Mismatches transplantiert werden (OPELZ, 1991). Obwohl jedoch im Querschnitt durch eine transplantierte Population der Grad der HLA-Übereinstimmung mit der Wahrscheinlichkeit für Abstoßungsreaktionen korreliert, kann eine HLA-Übereinstimmung nicht einen abstoßungsfreien Verlauf im Einzelfall vorhersagen. Passend zu dieser klinischen Beobachtung konnte diese Arbeit zeigen, daß die Anzahl an HLA-A- und HLA-B-Mismatches signifikant mit der Prävalenz alloreaktiver CD8-T-Zellen in einer großen Gruppe aus 106 zufälligen Spender-Empfänger-Kombinationen korrelierte, während die HLA-Übereinstimmung nicht das alloreaktive Potential einer individuellen Kombination voraussagen konnte. Die Gründe für dieses Phänomen sind vielschichtig. Zum einen können HLA-Unterschiede auf Nukleotidebene vorliegen, die durch die serologischen Standardtypisierungen nicht erfaßt werden (BAXTER-LOWE et al., 1992; SANTAMARIA et al., 1994). Weiterhin werden nicht alle HLA-Moleküle getestet, so daß Mismatches in den nicht getesteten HLA-Molekülen für direktes T-Zellpriming zur Verfügung stehen. Auch Unterschiede in Minor-Histokompatibilitäts-Antigenen können von T-Zellen auf direktem Wege erkannt werden (BERGER et al., 1994; MENDOZA et al., 1997). Und nicht zuletzt kann die gesamte Immunanamnese eines Menschen, sei es die Auseinandersetzung mit viralen, bakteriellen oder parasitären Antigenen, die Verabreichung von Blut oder Blutprodukten, frühere Schwangerschaften etc., zur Expansion von allo-kreuzreagierenden T-Zellklonen und zur Ausbildung von Memory-T-Zellen führen (LOMBARDI et al., 1990; LECHLER et al., 1992; BREHM et al., 2003). Die Aggravation oder Auslösung von Abstoßungsepisoden durch CMV-Infektion eines Allotransplantatempfängers wurde eine Zeitlang unspezifischen immunologischen Phänomenen zugeschrieben, doch es scheint auch hier Kreuzreaktivität mit donorspezifischen HLA-Molekülen ein wichtiger Faktor zu sein. Gerade in den letzten Monaten sind mehrere Arbeiten erschienen, die zeigen konnten, daß Infektionen mit persistierenden Viren lebenslang Memory-T-Zellen mit sehr niedriger Aktivierungsschwelle hinterlassen, die dann im Falle einer Transplantation mit kreuzreagierenden HLA-Molekülen

eine zügige direkte Abstoßung triggern können (ADAMS et al., 2003; CHEN et al., 2004). Akute Infektionen mit nicht persistierenden Viren oder anderen Erregern sind hierzu ebenfalls potentiell in der Lage. In dieser Kreuzreaktivität liegt eine mögliche Erklärung für das bekannte Phänomen der "taboo mismatches", und zwar über den Mechanismus der Infektion mit weit verbreiteten Erregern, deren antigene Determinanten einem bestimmten MHC-Antigen ähnlich sind und somit kreuzreaktive T-Zellklone expandieren, die auch gegen diese MHC-Moleküle gerichtet sind. In unserem getesteten Kollektiv gab es Konstellationen mit fehlender präformierter Alloreaktivität trotz vier vorhandener HLA-I-Mismatches. Auf der anderen Seite konnten bei manchen Probanden mit nur zwei Mismatches hohe Frequenzen alloreaktiver T-Zellen gemessen werden. Zusammengenommen mit der signifikanten Korrelation präformierter Alloreaktivität mit der Transplantatprognose (HEEGER et al., 1999) könnten diese Beobachtungen entscheidende Bedeutung erlangen bei der Identifizierung von Patienten, die ein erhöhtes Risiko für eine Abstoßung nach Transplantation tragen. Entsprechend könnte das individuelle Risiko, anstatt streng an den Grad der HLA-Übereinstimmung gekoppelt zu sein, zu einem entscheidenden Teil vom Ausmaß präformierter, donorspezifischer T-Zell-Reaktivität bestimmt sein. Daher erscheint eine große kontrollierte Studie sinnvoll zur Klärung der Frage, ob die Testung auf präformierte alloreaktive T-Zellen in Kombination mit der HLA-Typisierung bei der Vorhersage des Transplantatüberlebens womöglich dem konventionellen HLA-Matching überlegen ist.

Die erfolgreiche Identifizierung von Hochrisikopatienten sollte idealerweise gefolgt sein von Strategien, die auf eine Individualisierung der immunsuppressiven oder immunmodulatorischen Therapie ausgerichtet sind. Denkbare therapeutische Konsequenzen wären beispielsweise individuelle Dosiskorrektur der immunsuppressiven Medikation oder T-Zelldepletion vor Transplantation. Solche T-Zelldepletions-Strategien erscheinen besonders vielversprechend bei Patienten mit hohen Frequenzen alloreaktiver T-Zellen. Da präformierte T-Zell-Alloreaktivität mit der von uns vorgestellten Methode innerhalb von Stunden bestimmt werden kann, könnte dieser Ansatz prospektive Studien erleichtern, die auf Individualisierung und Überwachung konventioneller und neuer Behandlungsstrategien ausgerichtet sind.

Zusammengenommen eröffnen die beiden in dieser Arbeit vorgestellten Methoden interessante Möglichkeiten, neue Einblicke in die Wirkung von Immunsuppressiva *in vivo* und die Mechanismen der Allotransplantatabstoßung zu gewinnen. Darüber hinaus liefern sie wertvolle Hilfsmittel für prospektive Studien mit dem Ziel, die Individualisierung der immunsuppressiven Therapie voranzutreiben und diese damit für den Patienten effizienter und sicherer zu machen.

6 Literaturverzeichnis

1. (1985) A randomized clinical trial of OKT3 monoclonal antibody for acute rejection of cadaveric renal transplants. Ortho Multicenter Transplant Study Group. *N Engl J Med* 313:337-342
2. Adams AB, Williams MA, Jones TR, Shirasugi N, Durham MM, Kaech SM, Wherry EJ, Onami T, Lanier JG, Kokko KE, Pearson TC, Ahmed R, Larsen CP (2003) Heterologous immunity provides a potent barrier to transplantation tolerance. *J Clin Invest* 111:1887-1895
3. Ahmed M, Venkataraman R, Logar AJ, Rao AS, Bartley GP, Robert K, Dodson FS, Shapiro R, Fung JJ, Zeevi A (2001) Quantitation of immunosuppression by tacrolimus using flow cytometric analysis of interleukin-2 and interferon-gamma inhibition in CD8(-) and CD8(+) peripheral blood T cells. *Ther Drug Monit* 23:354-362
4. Aumente Rubio MD, Arizon del Prado JM, Lopez Malo de Molina MD, Cardenas Aranzana M, Segura Saint-Gerons J, Lopez Granados A, Rodriguez Esteban E, Mesa Rubio D, Romo Penas E, Segura Saint-Gerons C (2003) Clinical pharmacokinetics of tacrolimus in heart transplantation: new strategies of monitoring. *Transplant Proc* 35:1988-1991
5. Auphan N, DiDonato JA, Rosette C, Helmberg A, Karin M (1995) Immunosuppression by glucocorticoids: inhibition of NF-kappa B activity through induction of I kappa B synthesis. *Science* 270:286-290
6. AyanlarBatuman O, Ferrero AP, Diaz A, Jimenez SA (1991) Regulation of transforming growth factor-beta 1 gene expression by glucocorticoids in normal human T lymphocytes. *J Clin Invest* 88:1574-1580
7. Batiuk TD, Pazderka F, Enns J, DeCastro L, Halloran PF (1995) Cyclosporine inhibition of calcineurin activity in human leukocytes in vivo is rapidly reversible. *J Clin Invest* 96:1254-1260
8. Baxter-Lowe LA, Eckels DD, Ash R, Casper J, Hunter JB, Gorski J (1992) The predictive value of HLA-DR oligotyping for MLC responses. *Transplantation* 53:1352-1357
9. Becker YT, Becker BN, Pirsch JD, Sollinger HW (2004) Rituximab as treatment for refractory kidney transplant rejection. *Am J Transplant* 4:996-1001
10. Berger M, Wettstein PJ, Korngold R (1994) T cell subsets involved in lethal graft-versus-host disease directed to immunodominant minor histocompatibility antigens. *Transplantation* 57:1095-1102
11. Bram RJ, Hung DT, Martin PK, Schreiber SL, Crabtree GR (1993) Identification of the immunophilins capable of mediating inhibition of signal transduction by cyclosporin A and FK506: roles of calcineurin binding and cellular location. *Mol Cell Biol* 13:4760-4769
12. Braun WE (2003) Renal transplantation: basic concepts and evolution of therapy. *J Clin Apheresis* 18:141-152
13. Brehm MA, Markees TG, Daniels KA, Greiner DL, Rossini AA, Welsh RM (2003) Direct visualization of cross-reactive effector and memory allo-specific CD8 T cells generated in response to viral infections. *J Immunol* 170:4077-4086
14. Brinkmann V, Cyster JG, Hla T (2004) FTY720: sphingosine 1-phosphate receptor-1 in the control of lymphocyte egress and endothelial barrier function. *Am J Transplant* 4:1019-1025
15. Britt WJ, Alford CA (1996). Cytomegalovirus. In Fields Virology, Fields BN, DM Knipe, PM Holley, eds. (Philadelphia, Lippincott-Raven Publishers), pp. 2493-2523.
16. Calne R, Moffatt SD, Friend PJ, Jamieson NV, Bradley JA, Hale G, Firth J, Bradley J, Smith KG, Waldmann H (1999) Campath 1H allows low-dose cyclosporine monotherapy in 31 cadaveric renal allograft recipients. *Transplantation* 68:1613-1616
17. Campbell PM, Pimm J, Ramassar V, Halloran PF (1996) Identification of a calcium-inducible, cyclosporine sensitive element in the IFN-gamma promoter that is a potential NFAT binding site. *Transplantation* 61:933-939
18. Cardenas ME, Hemenway C, Muir RS, Ye R, Fiorentino D, Heitman J (1994) Immunophilins interact with calcineurin in the absence of exogenous immunosuppressive ligands. *Embo J* 13:5944-5957

19. Cardenas ME, Zhu D, Heitman J (1995) Molecular mechanisms of immunosuppression by cyclosporine, FK506, and rapamycin. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 4:472-477
20. Chen Y, Heeger PS, Valujskikh A (2004) In vivo helper functions of alloreactive memory CD4+ T cells remain intact despite donor-specific transfusion and anti-CD40 ligand therapy. *J Immunol* 172:5456-5466
21. Chensue SW, Terebuh PD, Remick DG, Scales WE, Kunkel SL (1991) In vivo biologic and immunohistochemical analysis of interleukin-1 alpha, beta and tumor necrosis factor during experimental endotoxemia. Kinetics, Kupffer cell expression, and glucocorticoid effects. *Am J Pathol* 138:395-402
22. Chung SW, Yoshida EM, Cattral MS, Hu Y, Gorczynski RM (1998) Donor-specific stimulation of peripheral blood mononuclear cells from recipients of orthotopic liver transplants is associated, in the absence of rejection, with type-2 cytokine production. *Immunol Lett* 63:91-96
23. Claas FH, Roelen DL, Oudshoorn M, Doxiadis, II (2003) Future HLA matching strategies in clinical transplantation. *Dev Ophthalmol* 36:62-73
24. Cohen B, Persijn GG (2004). Eurotransplant International Foundation Annual Report 2003
25. Dallman MJ (1995) Cytokines and transplantation: Th1/Th2 regulation of the immune response to solid organ transplants in the adult. *Curr Opin Immunol* 7:632-638
26. Dallman MJ, Roake J, Hughes D, Toogood G, Morris PJ (1992) Sequential analysis of IL-2 gene transcription in renal transplants. *Transplantation* 53:683-685
27. Daynes RA, Araneo BA (1989) Contrasting effects of glucocorticoids on the capacity of T cells to produce the growth factors interleukin 2 and interleukin 4. *Eur J Immunol* 19:2319-2325
28. de Haan A, van den Berg AP, van der Bij W, Hepkema BG, Bruin-van Dijk E, van der Gun I, Lems SP, Slooff MJ, Haagsma EB, de Leij LF, Prop J (2001) Rapid decreases in donor-specific cytotoxic T lymphocyte precursor frequencies and graft outcome after liver and lung transplantation. *Transplantation* 71:785-791
29. De Haan A, Van Der Gun I, Van Der Bij W, De Leij LF, Prop J (2002) Detection of alloreactive T cells by flow cytometry: a new test compared with limiting dilution assay. *Transplantation* 74:562-570
30. Dinter A, Berger EG (1998) Golgi-disturbing agents. *Histochem Cell Biol* 109:571-590
31. Dutton RW, Bradley LM, Swain SL (1998) T cell memory. *Annu Rev Immunol* 16:201-223
32. Ellis D (1995) Clinical use of tacrolimus (FK-506) in infants and children with renal transplants. *Pediatr Nephrol* 9:487-494
33. Eugui EM, Allison AC (1993) Immunosuppressive activity of mycophenolate mofetil. *Ann N Y Acad Sci* 685:309-329
34. Fauci AS (1975) Mechanisms of corticosteroid action on lymphocyte subpopulations. I. Redistribution of circulating T and B lymphocytes to the bone marrow. *Immunology* 28:669-680
35. Fishman JA, Rubin RH (1998) Infection in organ-transplant recipients. *N Engl J Med* 338:1741-1751
36. Flanagan WM, Corthesy B, Bram RJ, Crabtree GR (1991) Nuclear association of a T-cell transcription factor blocked by FK-506 and cyclosporin A. *Nature* 352:803-807
37. Fleischer B (1994) Superantigens. *Apmis* 102:3-12
38. Freed BM, Stevens C, Brooks C, Cramer S, Lempert N, Rosano TG (1991) Assessment of the biological activity of cyclosporine metabolites using the human JURKAT cell line. *Transplant Proc* 23:980-981
39. Gebauer BS, Hricik DE, Atallah A, Bryan K, Riley J, Tary-Lehmann M, Greenspan NS, DeJelo C, Boehm BO, Hering BJ, Heeger PS (2002) Evolution of the enzyme-linked immunosorbent spot assay for post-transplant alloreactivity as a potentially useful immune monitoring tool. *Am J Transplant* 2:857-866
40. Gonzalo JA, Gonzalez-Garcia A, Martinez C, Kroemer G (1993) Glucocorticoid-mediated control of the activation and clonal deletion of peripheral T cells in vivo. *J Exp Med* 177:1239-1246
41. Halloran PF (2004) Immunosuppressive drugs for kidney transplantation. *N Engl J Med* 351:2715-2729

42. Heeger PS (2003) T-cell allorecognition and transplant rejection: a summary and update. *Am J Transplant* 3:525-533
43. Heeger PS, Greenspan NS, Kuhlenschmidt S, DeJelo C, Hricik DE, Schulak JA, Tary-Lehmann M (1999) Pretransplant frequency of donor-specific, IFN-gamma-producing lymphocytes is a manifestation of immunologic memory and correlates with the risk of posttransplant rejection episodes. *J Immunol* 163:2267-2275
44. Henderson DJ, Naya I, Bundick RV, Smith GM, Schmidt JA (1991) Comparison of the effects of FK-506, cyclosporin A and rapamycin on IL-2 production. *Immunology* 73:316-321
45. Herzog WR, Zanker B, Irschick E, Huber C, Franz HE, Wagner H, Kabelitz D (1987) Selective reduction of donor-specific cytotoxic T lymphocyte precursors in patients with a well-functioning kidney allograft. *Transplantation* 43:384-389
46. Ho S, Clipstone N, Timmermann L, Northrop J, Graef I, Fiorentino D, Nourse J, Crabtree GR (1996) The mechanism of action of cyclosporin A and FK506. *Clin Immunol Immunopathol* 80:S40-45
47. Iwasaki K, Shiraga T, Matsuda H, Nagase K, Tokuma Y, Hata T, Fujii Y, Sakuma S, Fujitsu T, Fujikawa A, et al. (1995) Further metabolism of FK506 (tacrolimus). Identification and biological activities of the metabolites oxidized at multiple sites of FK506. *Drug Metab Dispos* 23:28-34
48. Janeway CA, Travers P, Walport M, Shlomchik M (2002) *Immunologie*, 5 edn, Spektrum Akademischer Verlag GmbH).
49. Johansson A, Moller E (1990) Evidence that the immunosuppressive effects of FK506 and cyclosporine are identical. *Transplantation* 50:1001-1007
50. Karlsson AC, Martin JN, Younger SR, Bredt BM, Epling L, Ronquillo R, Varma A, Deeks SG, McCune JM, Nixon DF, Sinclair E (2003) Comparison of the ELISPOT and cytokine flow cytometry assays for the enumeration of antigen-specific T cells. *J Immunol Methods* 283:141-153
51. Kino T, Hatanaka H, Hashimoto M, Nishiyama M, Goto T, Okuhara M, Kohsaka M, Aoki H, Imanaka H (1987a) FK-506, a novel immunosuppressant isolated from a *Streptomyces*. I. Fermentation, isolation, and physico-chemical and biological characteristics. *J Antibiot (Tokyo)* 40:1249-1255
52. Kino T, Hatanaka H, Miyata S, Inamura N, Nishiyama M, Yajima T, Goto T, Okuhara M, Kohsaka M, Aoki H, et al. (1987b) FK-506, a novel immunosuppressant isolated from a *Streptomyces*. II. Immunosuppressive effect of FK-506 in vitro. *J Antibiot (Tokyo)* 40:1256-1265
53. Knoop C, Vervier I, Thiry P, De Backer M, Kovarik JM, Rousseau A, Marquet P, Estenne M (2003) Cyclosporine pharmacokinetics and dose monitoring after lung transplantation: comparison between cystic fibrosis and other conditions. *Transplantation* 76:683-688
54. Krieger NR, Yin DP, Fathman CG (1996) CD4+ but not CD8+ cells are essential for allorecognition. *J Exp Med* 184:2013-2018
55. Laskow DA, Neylan JF, 3rd, Shapiro RS, Pirsch JD, Vergne-Marini PJ, Tomlanovich SJ (1998) The role of tacrolimus in adult kidney transplantation: a review. *Clin Transplant* 12:489-503
56. Lechler RI, Heaton T, Barber L, Bal V, Batchelor JR, Lombardi G (1992) Molecular mimicry by major histocompatibility complex molecules and peptides accounts for some alloresponses. *Immunol Lett* 34:63-69
57. Lemaire M, Tillement JP (1982) Role of lipoproteins and erythrocytes in the in vitro binding and distribution of cyclosporin A in the blood. *J Pharm Pharmacol* 34:715-718
58. Liu Z, Colovai AI, Tugulea S, Reed EF, Fisher PE, Mancini D, Rose EA, Cortesini R, Michler RE, Suci-Foca N (1996) Indirect recognition of donor HLA-DR peptides in organ allograft rejection. *J Clin Invest* 98:1150-1157
59. Loh C, Carew JA, Kim J, Hogan PG, Rao A (1996) T-cell receptor stimulation elicits an early phase of activation and a later phase of deactivation of the transcription factor NFAT1. *Mol Cell Biol* 16:3945-3954
60. Lombardi G, Sidhu S, Daly M, Batchelor JR, Makgoba W, Lechler RI (1990) Are primary alloresponses truly primary? *Int Immunol* 2:9-13
61. Madsen M, Kissmeyer-Nielsen F, Rasmussen P, Andersen P (1981) Decreased expression of HLA-DR antigens on peripheral blood B lymphocytes during glucocorticoid treatment. *Tissue Antigens* 17:195-204

62. Marx J (1995) How the glucocorticoids suppress immunity. *Science* 270:232-233
63. Matesic D, Lehmann PV, Heeger PS (1998) High-resolution characterization of cytokine-producing alloreactivity in naive and allograft-primed mice. *Transplantation* 65:906-914
64. Mayer AD, Dmitrewski J, Squifflet JP, Besse T, Grabensee B, Klein B, Eigler FW, Heemann U, Pichlmayr R, Behrend M, Vanrenterghem Y, Donck J, van Hooff J, Christiaans M, Morales JM, Andres A, Johnson RW, Short C, Buchholz B, Rehmert N, Land W, Schleibner S, Forsythe JL, Talbot D, Pohanka E, et al. (1997) Multicenter randomized trial comparing tacrolimus (FK506) and cyclosporine in the prevention of renal allograft rejection: a report of the European Tacrolimus Multicenter Renal Study Group. *Transplantation* 64:436-443
65. Mendoza LM, Paz P, Zuberi A, Christianson G, Roopenian D, Shastri N (1997) Minors held by majors: the H13 minor histocompatibility locus defined as a peptide/MHC class I complex. *Immunity* 7:461-472
66. Mestre M, Massip E, Bas J, Alsina J, Romeu A, Castela AM, Buendia E, Grinyo JM (1996) Longitudinal study of the frequency of cytotoxic T cell precursors in kidney allograft recipients. *Clin Exp Immunol* 104:108-114
67. Nagase K, Iwasaki K, Nozaki K, Noda K (1994) Distribution and protein binding of FK506, a potent immunosuppressive macrolide lactone, in human blood and its uptake by erythrocytes. *J Pharm Pharmacol* 46:113-117
68. Najafian N, Salama AD, Fedoseyeva EV, Benichou G, Sayegh MH (2002) Enzyme-linked immunosorbent spot assay analysis of peripheral blood lymphocyte reactivity to donor HLA-DR peptides: potential novel assay for prediction of outcomes for renal transplant recipients. *J Am Soc Nephrol* 13:252-259
69. Ng WF, Hernandez-Fuentes M, Baker R, Chaudhry A, Lechler RI (2002) Reversibility with interleukin-2 suggests that T cell anergy contributes to donor-specific hyporesponsiveness in renal transplant patients. *J Am Soc Nephrol* 13:2983-2989
70. Northrop JP, Ho SN, Chen L, Thomas DJ, Timmerman LA, Nolan GP, Admon A, Crabtree GR (1994) NF-AT components define a family of transcription factors targeted in T-cell activation. *Nature* 369:497-502
71. Ochiai T, Nakajima K, Nagata M, Suzuki T, Asano T, Uematsu T, Goto T, Hori S, Kenmochi T, Nakagoori T, et al. (1987) Effect of a new immunosuppressive agent, FK 506, on heterotopic cardiac allotransplantation in the rat. *Transplant Proc* 19:1284-1286
72. Opelz G (1991) HLA matching should be utilized for improving kidney transplant success rates. *Transplant Proc* 23:46-50
73. Opelz G, Schwarz V, Engelmann A, Back D, Wilk M, Keppel E (1991) Long-term impact of HLA matching on kidney graft survival in cyclosporine-treated recipients. *Transplant Proc* 23:373-375
74. Paglieroni TG, Perez R, Katznelson S, Muto K, Chang T, Scott S, MacKenzie MR, Holland PV (1999) Donor cell induced CD69 expression and intracellular IL-2 and IL-4 production by peripheral blood lymphocytes isolated from kidney transplant recipients. *Hum Immunol* 60:41-56
75. Penn I (2000) Post-transplant malignancy: the role of immunosuppression. *Drug Saf* 23:101-113
76. Pietra BA, Wiseman A, Bolwerk A, Rizeq M, Gill RG (2000) CD4 T cell-mediated cardiac allograft rejection requires donor but not host MHC class II. *J Clin Invest* 106:1003-1010
77. Pirsch JD, Miller J, Deierhoi MH, Vincenti F, Filo RS (1997) A comparison of tacrolimus (FK506) and cyclosporine for immunosuppression after cadaveric renal transplantation. FK506 Kidney Transplant Study Group. *Transplantation* 63:977-983
78. Rao A, Luo C, Hogan PG (1997) Transcription factors of the NFAT family: regulation and function. *Annu Rev Immunol* 15:707-747
79. Rostaing L, Puyoo O, Tkaczuk J, Peres C, Rouzaud A, Cisterne JM, de Preval C, Ohayon E, Durand D, Abbal M (1999) Differences in Type 1 and Type 2 intracytoplasmic cytokines, detected by flow cytometry, according to immunosuppression (cyclosporine A vs. tacrolimus) in stable renal allograft recipients. *Clin Transplant* 13:400-409

80. Ruers TJ, Buurman WA, van Boxtel CJ, van der Linden CJ, Kootstra G (1987) Immunohistological observations in rat kidney allografts after local steroid administration. *J Exp Med* 166:1205-1220
81. Santamaria P, Reinsmoen NL, Lindstrom AL, Boyce-Jacino MT, Barbosa JJ, Faras AJ, McGlave PB, Rich SS (1994) Frequent HLA class I and DP sequence mismatches in serologically (HLA-A, HLA-B, HLA-DR) and molecularly (HLA-DRB1, HLA-DQA1, HLA-DQB1) HLA-identical unrelated bone marrow transplant pairs. *Blood* 83:280-287
82. Sayegh MH, Akalin E, Hancock WW, Russell ME, Carpenter CB, Linsley PS, Turka LA (1995) CD28-B7 blockade after alloantigenic challenge in vivo inhibits Th1 cytokines but spares Th2. *J Exp Med* 181:1869-1874
83. Schutz E, Svinarov D, Shipkova M, Niedmann PD, Armstrong VW, Wieland E, Oellerich M (1998) Cyclosporin whole blood immunoassays (AxSYM, CEDIA, and Emit): a critical overview of performance characteristics and comparison with HPLC. *Clin Chem* 44:2158-2164
84. Sester M, Gartner BC, Sester U, Girndt M, Mueller-Lantzsch N, Kohler H (2003) Is the cytomegalovirus serologic status always accurate? A comparative analysis of humoral and cellular immunity. *Transplantation* 76:1229-1230
85. Sester M, Sester U, Alarcon Salvador S, Heine G, Lipfert S, Girndt M, Gartner B, Kohler H (2002a) Age-related decrease in adenovirus-specific T cell responses. *J Infect Dis* 185:1379-1387
86. Sester M, Sester U, Clauer P, Heine G, Mack U, Moll T, Sybrecht GW, Lalvani A, Kohler H (2004a) Tuberculin skin testing underestimates a high prevalence of latent tuberculosis infection in hemodialysis patients. *Kidney Int* 65:1826-1834
87. Sester M, Sester U, Gartner B, Heine G, Girndt M, Mueller-Lantzsch N, Meyerhans A, Kohler H (2001) Levels of virus-specific CD4 T cells correlate with cytomegalovirus control and predict virus-induced disease after renal transplantation. *Transplantation* 71:1287-1294
88. Sester M, Sester U, Gartner B, Kubuschok B, Girndt M, Meyerhans A, Kohler H (2002b) Sustained high frequencies of specific CD4 T cells restricted to a single persistent virus. *J Virol* 76:3748-3755
89. Sester U, Thijssen S, van Bentum K, Neumann F, Kubuschok B, Sester M, Kohler H (2004b) Rapid identification of preformed alloreactive T cells for use in a clinical setting. *Transplantation* 78:607-614
90. Shaw KT, Ho AM, Raghavan A, Kim J, Jain J, Park J, Sharma S, Rao A, Hogan PG (1995) Immunosuppressive drugs prevent a rapid dephosphorylation of transcription factor NFAT1 in stimulated immune cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:11205-11209
91. Smith KD, Lutz CT (1997) Alloreactive T cell recognition of MHC class I molecules: the T cell receptor interacts with limited regions of the MHC class I long alpha helices. *J Immunol* 158:2805-2812
92. Steimer W (1999) Performance and specificity of monoclonal immunoassays for cyclosporine monitoring: how specific is specific? *Clin Chem* 45:371-381
93. Stein CM, Murray JJ, Wood AJ (1999) Inhibition of stimulated interleukin-2 production in whole blood: a practical measure of cyclosporine effect. *Clin Chem* 45:1477-1484
94. Suthanthiran M (1997) Molecular analyses of human renal allografts: differential intragraft gene expression during rejection. *Kidney Int Suppl* 58:S15-21
95. Suthanthiran M, Strom TB (1994) Renal transplantation. *N Engl J Med* 331:365-376
96. Tiede I, Fritz G, Strand S, Poppe D, Dvorsky R, Strand D, Lehr HA, Wirtz S, Becker C, Atreya R, Mudter J, Hildner K, Bartsch B, Holtmann M, Blumberg R, Walczak H, Iven H, Galle PR, Ahmadian MR, Neurath MF (2003) CD28-dependent Rac1 activation is the molecular target of azathioprine in primary human CD4+ T lymphocytes. *J Clin Invest* 111:1133-1145
97. Timmerman LA, Clipstone NA, Ho SN, Northrop JP, Crabtree GR (1996) Rapid shuttling of NF-AT in discrimination of Ca²⁺ signals and immunosuppression. *Nature* 383:837-840
98. Tsunoda SM, Aweeka FT (1996) The use of therapeutic drug monitoring to optimise immunosuppressive therapy. *Clin Pharmacokinet* 30:107-140
99. Vacca A, Felli MP, Farina AR, Martinotti S, Maroder M, Screpanti I, Meco D, Petrangeli E, Frati L, Gulino A (1992) Glucocorticoid receptor-mediated suppression of the interleukin 2 gene expression through impairment of the cooperativity between

- nuclear factor of activated T cells and AP-1 enhancer elements. *J Exp Med* 175:637-646
100. van Bentum K (2005) Promotionsschrift (unveröffentlicht), Universität des Saarlandes, Homburg.
 101. van den Berg AP, Twilhaar WN, Mesander G, van Son WJ, van der Bij W, Klompaker IJ, Slooff MJ, The TH, de Leij LH (1998a) Quantitation of immunosuppression by flow cytometric measurement of the capacity of T cells for interleukin-2 production. *Transplantation* 65:1066-1071
 102. van den Berg AP, Twilhaar WN, van Son WJ, van der Bij W, Klompaker IJ, Slooff MJ, The TH, de Leij LH (1998b) Quantification of immunosuppression by flow cytometric measurement of intracellular cytokine synthesis. *Transpl Int* 11 Suppl 1:S318-321
 103. Woo J (1994) Therapeutic monitoring of cyclosporine. *Ann Clin Lab Sci* 24:60-68
 104. Worrall NK, Misko TP, Sullivan PM, Hui JJ, Rodi CP, Ferguson TB, Jr. (1996) Corticosteroids inhibit expression of inducible nitric oxide synthase during acute cardiac allograft rejection. *Transplantation* 61:324-328
 105. Zubiaga AM, Munoz E, Huber BT (1992) IL-4 and IL-2 selectively rescue Th cell subsets from glucocorticoid-induced apoptosis. *J Immunol* 149:107-112

7 Danksagung

Diese Promotionsarbeit war ein aufwendiges Projekt, zu dessen Realisierung und erfolgreichem Abschluß viele Menschen beigetragen haben, bei denen ich mich an dieser Stelle bedanken möchte.

An erster Stelle möchte ich ganz herzlich Herrn Prof. Dr. Hans Köhler danken für die Möglichkeit, an diesem spannenden und aktuellen Thema in seinem Forschungslabor zu arbeiten, und für die durchweg angenehme und konstruktive Atmosphäre, die meine Laborzeit zu einer sehr schönen Erfahrung gemacht hat. Auch möchte ich Herrn Prof. Köhler ganz besonders danken für die Möglichkeit, meine Forschungsergebnisse auf Kongressen vorzustellen zu dürfen.

Frau PD Dr. Martina Sester und Herrn Dr. Urban Sester gilt als meinen Betreuern mein ganz besonderer Dank. Sie haben nachhaltig meine Begeisterung für das Gebiet der Immunologie geweckt. Ich möchte ihnen an dieser Stelle von Herzen danken für Ihre unablässige, engagierte Unterstützung, die vielen lehrreichen Diskussionen und die unglaublich angenehme, mitreißende und motivierende Stimmung, die sie im Labor und darüber hinaus geschaffen haben. Ein besseres Betreuer-Team ist schlichtweg nicht vorstellbar. Und stünde ich erneut vor der Entscheidung, mit Martina und Urban Sester zusammen dieses Projekt zu beginnen, so würde ich keine Sekunde zögern.

Mein Dank gilt auch Frau Prof. Dr. Barbara Gärtner, die mir im Rahmen ihrer engen und erfolgreichen Zusammenarbeit mit dem nephrologischen Forschungslabor dieses Projekt ans Herz gelegt hat.

Unseren medizinisch-technischen Assistentinnen Frau Andrea Armbrüster und Frau Candida Guckelmus danke ich für Ihre Unterstützung und die angenehme Zusammenarbeit. Sie haben mir gezeigt, Laborabläufe zu organisieren und effizient zu verschachteln.

Nicht zuletzt gebührt mein Dank den zahlreichen Patienten, Laborkollegen, Freunden und Bekannten, die durch Ihre Spende von Blutproben für Forschungszwecke diese Arbeit erst möglich gemacht haben.

8 Lebenslauf

Nachname	Thijssen
Vorname	Stephan
Geburtsdatum	12. Juli 1973
Geburtsort	Hamm, Deutschland
Name des Vaters	Thijssen, Johannes
Beruf des Vaters	IT Manager
Name der Mutter	Thijssen, Grete (geborene Klement)
Beruf der Mutter	Hausfrau

Schulbildung	1980 - 1984	Grundschule St. Willibrord in Kleve
	1984 - 1993	Konrad-Adenauer-Gymnasium in Kleve
	1993	Abitur
Zivildienst	1993 - 1994	Rotes Kreuz Deutschland Währenddessen Ausbildung zum Rettungshelfer
Hochschulbildung	Oktober 1994	Aufnahme des Studiums der Humanmedizin an der Universität des Saarlandes in Homburg
	Oktober 1999 – Oktober 2000	Experimenteller Teil meiner Doktorarbeit bei Herrn Prof. Dr. Hans Köhler auf dem Gebiet der Nephrologie und Immunologie im nephrologischen Forschungslabor der Inneren Medizin IV an der Universität des Saarlandes, Homburg

Praktisches Jahr des Medizinstudiums:

1. Tertial Wahlfach Neurologie bei Herrn Prof. Becker an den Universitätskliniken Homburg
2. Tertial Chirurgie (Neurochirurgie und Traumatologie) bei Herrn Prof. Steudel und Herrn Prof. Pohlemann an den Universitätskliniken Homburg
3. Tertial Innere Medizin (u.a. Pulmonologie, Nephrologie, Kardiologie) an der Tulane University School of Medicine in New Orleans, LA, USA)

Ende April 2002	Abschluß des Medizinstudiums mit der Gesamtnote 1,66
-----------------	--

Berufliche Tätigkeiten	Oktober 2002 – April 2004	Arzt im Praktikum in der Klinik für Innere Medizin IV, Nieren- und Hochdruckkrankheiten, am Universitätsklinikum des Saarlandes, Homburg/Saar
	seit April 2004	Assistenzarzt in der Klinik für Innere Medizin IV, Nieren- und Hochdruckkrankheiten, am Universitätsklinikum des Saarlandes, Homburg/Saar